



Contribution à l'étude de la morbi-mortalité lors de l'usage de drogues récréatives : GHB-THC, seuls ou associés à l'éthanol

Olivier Roussel

► To cite this version:

Olivier Roussel. Contribution à l'étude de la morbi-mortalité lors de l'usage de drogues récréatives : GHB-THC, seuls ou associés à l'éthanol. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05P628 . tel-00781683

HAL Id: tel-00781683

<https://theses.hal.science/tel-00781683>

Submitted on 28 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

ECOLE DOCTORALE MTCE Médicament, Toxicologie, Chimie, Environnement

Année 2012

N°

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

ROUSSEL, Olivier

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA MORBI-MORTALITE LORS DE L'USAGE DE
DROGUES RECREATIVES : GHB – THC, SEULS OU ASSOCIES A L'ETHANOL**

Thèse dirigée par M. le Professeur Frédéric BAUD

soutenue publiquement le 20 novembre 2012

Membres du jury :

M. le Professeur Frédéric BAUD, Directeur de thèse

M. le Docteur Pascal HOUZÉ, Codirecteur de thèse

M. le Docteur Marc DEVEAUX, Rapporteur

M. le Docteur Jorge GALLEGGO, Rapporteur

M. le Professeur Xavier DECLEVES

M. le Professeur Jean-Pol TASSIN

M. le Docteur Yves SCHULIAR

M. le Docteur Ivan RICORDEL, membre invité

Je dédie cette thèse à ma famille qui m'a soutenu pendant ces quatre années,

A Virginie qui a su compenser mes présences fantômes,

caché derrière mon ordinateur,

A Thomas, Batiste et Gabriel qui ont compris que Papa travaillait à la maison et

ont patienté... les garçons, promis, je serai plus présent maintenant,

A vous quatre qui m'avez réconforté dans les moments de doute et de fatigue,

J'espère que ce travail est à la hauteur de nos sacrifices.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Frédéric J. Baud

Pour votre accueil au sein de votre équipe alors que mon lointain DEA était d'une autre thématique.

Pour avoir choisir un thème conciliant vos travaux et mes attentes professionnelles et avoir accepté de diriger cette Thèse.

Pour la confiance que vous m'avez accordée.

Pour vos précieux conseils et avis, tout au long de ces travaux.

Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma gratitude.

A Monsieur le Docteur Pascal Houzé

Pascal, il me sera bien difficile de te remercier en quelques lignes.

Tu as été présent à toutes les étapes de cette Thèse.

Tu as su me conseiller avec franchise et gentillesse.

Tu as été le premier lecteur de tous mes documents, souvent trop volumineux.

Toujours disponible et à l'écoute, tu m'as soutenu lors des moments de doute.

Tu as pris le temps de mettre en œuvre les dosages par électrophorèse capillaire.

Sans toi, cette Thèse ne serait pas.

Tu as toute ma gratitude et mon respect.

A Messieurs les Docteurs Jorge Gallego et Marc Deveaux

Vous avez accepté de participer au jury de cette Thèse en qualité de rapporteurs. Je mesure pleinement le grand honneur que vous me faites. Je vous remercie pour l'intérêt porté à ces travaux et le temps consacré à son jugement. Soyez assurés de ma sincère reconnaissance.

A Messieurs les Professeurs Jean-Pol Tassin et Xavier Declèves

A Monsieur le Médecin chef des services de classe normale Yves Schuliar

Vous avez accepté de juger cette Thèse en qualité d'examineurs. J'en suis très honoré. Soyez assurés de mon profond respect et de mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Pharmacien en chef (ER) Ivan Ricordel, Professeur agrégé du Val-de-Grâce

Vous avez accepté de participer à ce jury de thèse, j'en suis très honoré. Je vous remercie aussi pour votre rôle initiateur dans cette Thèse, vous m'avez fait rencontrer l'équipe de recherche avec laquelle ces travaux ont été menés. Soyez assuré de mon profond respect et de ma gratitude.

**A Monsieur le Professeur Jean-Michel Scherrmann, Directeur de l'unité INSERM U705
CNRS UMR8206**

Pour m'avoir accepté au sein de votre unité de recherche.

Pour votre soutien et votre sollicitude.

Très respectueusement.

A Monsieur le Professeur Bruno Mégarbane

Pour ta disponibilité et ton soutien à ces travaux.

Très respectueusement.

A Madame Patricia Risède

Patricia, sans toi, une partie de ces travaux ne serait pas.

Tu m'as accueilli avec gentillesse et prévenance.

Tu as partagé ton expérience de l'expérimentation animale et m'as enseigné la technique du cathétérisme de l'artère fémorale. Tu l'as mis en œuvre seule quand je ne pouvais être présent.

Tu as su préparer avec beaucoup d'efficacité mes semaines de présence au laboratoire et tu m'as aidé à organiser ces travaux.

Pour ton amitié aussi ... sois en remerciée pleinement

A Madame Odile Dumont

Pour votre gestion sans faille des commandes, votre disponibilité et votre gentillesse.

A Madame le Docteur Lucie Chevillard

Lucie, tu as été présente dès le début de ces travaux, tu m'as toujours aidé et soutenu même par delà les océans. Le cathétérisme, l'anglais et la modélisation cinétique n'ont plus secret pour toi, merci de les partager avec tant de gentillesse, d'enthousiasme et d'amitié, Coach.

A Monsieur Hisham Alhadda

Hisham, alors que tu traverses des moments difficiles, sois assuré de mon amitié et de mon soutien. Nos discussions me sont précieuses. A cette heure, je ne sais pas de nous deux qui soutiendra en premier mais je suis confiant quant à la qualité de tes travaux.

A Madame le Docteur Déborah Hirt

Déborah, tu m'as accueilli au sein de ton laboratoire avec gentillesse et prévenance. Tu m'as enseigné les principes de modélisation de population et tu as pris sur ton temps pour m'aider à valider les modèles finaux. Sois en remerciée.

A Monsieur le Docteur Marcel Debray

Pour votre gentillesse, votre disponibilité, votre accueil et votre aide à la compréhension des principes de modélisation.

A Madame Marion Landry et Monsieur Guillaume Masson

Vous avez tous deux travaillé sur ma thématique et vos résultats ont confortés les miens. Pouvoir mesurer la robustesse de ses résultats au cours d'une étude est un soutien précieux. Je vous en remercie.

A tout le personnel de l'unité INSERM U705 CNRS UMR8206

Pour votre accueil et votre gentillesse.

A Madame le Docteur Tania Duarte

Tania, nous avons débuté nos thèses simultanément au sein d'un même groupe. Pendant ces années, nous nous sommes soutenus mutuellement durant nos travaux et avons partagé des idées pour faire avancer les travaux de chacun. Tu n'as jamais hésité à prendre de ton temps pour m'aider lors des expérimentations, tu m'as d'ailleurs appris l'emploi des pléthysmographes et le cathétérisme de la veine caudale chez le rat. Nous avons partagé un certain nombre d'étapes de nos doctorats : modules d'enseignement, congrès, démarches administratives. Pour tout ceci, je te remercie et t'assure de mon amitié.

A Madame Nathalie Desbarle

Nathalie, tu es d'une efficacité redoutable. Merci pour ton aide dans toutes les étapes de cette Thèse.

A Monsieur Gérard Sadoc

Pour votre accueil au sein de votre unité et le temps passé à modifier la configuration Breath de votre logiciel Elphy. Sans votre travail, les respirations apneustiques n'auraient pas pu être détaillées si finement. Je vous remercie grandement.

A Madame le Professeur Christiane Garbay

Vous m'avez fait confiance et autorisé à m'inscrire en Doctorat puis soutenu pour l'obtention de la dérogation nécessaire à l'inscription en quatrième année. Madame le Professeur, soyez assurée de ma gratitude et de mon respect.

A Madame Elisabeth Hombrados

Pour votre grande gentillesse, votre grande efficacité et pour l'aide et le soutien apportés lors des démarches administratives.

A Madame Chantal Martin

Chantal, vous avez accueilli, il y a deux ans, nos pléthysmographes au sein de votre locaux et mis à disposition les moyens adaptés à nos exigences. Vous avez toujours été de très bons conseils lors de la conception des protocoles expérimentaux, vous avez soutenu nos démarches et nous avez aidés dans l'étude des doses létales médianes. Pour votre gentillesse et votre rigueur aussi, je vous remercie vivement.

A tout le personnel de l'animalerie centrale de la faculté de pharmacie

Pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur accueil.

A Madame la Pharmacienne en chef Martine Perrin

Martine, quelques lignes ne suffiront pas.

Un grand merci pour ton soutien tout au long de cette Thèse. Depuis ton départ, je mesure pleinement l'impact de cette Thèse sur ton travail à la tête du département. Merci de l'avoir accepté. Chef, sois assurée de mon respect, ma loyauté et mon amitié.

A Monsieur le Général de brigade Jacques Hébrard,

Pour avoir accepté que je m'engage dans ces travaux de thèse et qu'une partie des frais soit à la charge de l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale.

A Monsieur le Colonel François Daoust, Directeur de l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale

Pour votre soutien tout au long des travaux et pour avoir facilité leur réalisation.

A Monsieur le Colonel Patrick Touron, Directeur-adjoint de l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale

Patrick, tu as soutenu dès le début ma démarche à poursuivre mon cursus post-DEA. Je te remercie pour ton appui.

A mes collègues du département Toxicologie de l'IRCGN

Pour avoir compensé mes absences et avoir su prendre à leur charge certaines de mes responsabilités. Sans votre compréhension et votre soutien, ces travaux n'auraient pas pu aboutir, merci.

A Monsieur le Pharmacien général inspecteur (2S) Claude Renaudeau, Professeur agrégé du Val-de-Grâce

Mon Général, vous avez accepté et soutenu ma démarche au sein du Service de Santé des Armées. Soyez assuré de ma gratitude.

A Monsieur le Pharmacien général inspecteur Jean-François Chaulet,

Pour votre soutien tout au long de ce Doctorat.

A Monsieur le Pharmacien en chef Frédéric Dorandeu, Professeur agrégé du Val-de-Grâce

Frédéric, tu m'as soutenu dans cette démarche et t'es tenu au courant de l'avancée des travaux, merci.

A Madame Vivaine Damboise et à tout le personnel de la Bibliothèque Centrale du Service de Santé des Armées

Pour leur efficacité et leur promptitude à trouver les articles, sincères remerciements.

A l'IREB

Pour sa participation financière à l'étude de l'association du THC et de l'éthanol.

A toute ma famille

Pour l'ensemble de ce que je leur dois et leur affection.

Pour avoir compris et accepté les contraintes liées à ce travail.

A tous mes proches, amis, collègues et confrères s'étant enquis de l'avancement de ses travaux.

Enfin, je remercie celles et ceux qui n'auraient pas été nommés par oubli de ma part et les prie de m'en excuser.

Table des matières

Table des matières	12
Abréviations	17
Introduction	21
Chapitre 1 : matériels, techniques et méthodes	27
1 Matériels.....	27
1.1 Animaux	27
1.2 Réactifs.....	28
1.2.1 Anesthésiques et médicaments.....	28
1.2.2 Substances étudiées	28
1.2.2.1 Ethanol	28
1.2.2.2 Δ^9 -tétrahydrocannabinol	30
1.2.2.3 Acide γ -hydroxybutyrique.....	31
1.2.2.4 Conservation des solutions.....	33
1.2.3 Réactifs de dosage	34
1.2.3.1 Ethanol	34
1.2.3.2 Acide γ -hydroxybutyrique.....	34
1.2.3.3 Acides organiques	35
1.2.4 Gaz	35
1.3 Matériels.....	35
1.3.1 Consommables et petits matériels	35
1.3.2 Equipements	36
1.3.2.1 Appareil à gaz du sang	36
1.3.2.2 Pléthysmographe	37
1.3.2.3 Analyseur O ₂ -CO ₂	37
1.3.2.4 Dispositif de radiotélémetrie	38
1.3.2.5 Appareils de dosage	38
1.3.2.6 Autre matériel.....	39
1.4 Logiciels	39
2 Techniques	40
2.1 Anesthésie	40
2.2 Cathétérisme.....	40

2.2.1	Cathétérisme de l'artère fémorale	40
2.2.2	Cathétérisme de la veine caudale	40
2.3	Implantation des sondes de radiotélémétrie	41
3	Méthodes	41
3.1	Détermination de la dose létale médiane.....	41
3.2	Evaluation des signes cliniques.....	42
3.3	Gaz du sang	42
3.4	Pléthysmographie corps entier	44
3.4.1	Etude en ventilation de repos	45
3.4.2	Epreuves d'hypercapnie ou d'hypoxie exogènes intermittentes	45
3.4.3	Détermination des durées d'apnée	46
3.5	Méthodes de dosage	49
3.5.1	Dosage de l'éthanol	49
3.5.1.1	CPG/DIF.....	49
3.5.1.2	ET/CPG/DIF.....	50
3.5.2	Dosage du GHB par CPG/SM/SM.....	51
3.5.3	Dosage des acides organiques	52
3.6	Méthodes statistiques	53
3.7	Représentations graphiques.....	54
3.8	Paramètres cinétiques et modélisation	54
4	Protocoles expérimentaux	57
4.1	Règles générales	57
4.2	Détermination de la DL ₅₀	57
4.3	Cinétiques sanguines	57
4.3.1.1	Cinétiques sanguines artérielles	57
4.3.1.2	Cinétiques sanguines veineuses	58
4.4	Paramètres respiratoires	58
4.4.1	Paramètres respiratoires en ventilation de repos	58
4.4.2	Gaz du sang en ventilation de repos.....	59
4.4.3	Paramètres respiratoires lors des épreuves d'hypercapnie et d'hypoxie exogènes intermittentes	59
Chapitre 2 : études des effets respiratoires de l'éthanol.....		60
1	Etude A1 : Détermination de la DL ₅₀	60
2	Cinétiques sanguines d'éthanol.....	60

2.1	Etude A2 : Ethanolémies artérielles	60
2.2	Etude A3 : Ethanolémies veineuses	68
3	Paramètres respiratoires	70
3.1	Etude A4 : Paramètres respiratoires en ventilation de repos.....	70
3.1.1	Signes cliniques.....	70
3.1.2	Paramètres respiratoires	71
3.2	Etude A5 : Gaz du sang en ventilation de repos	74
3.2.1	Signes cliniques.....	74
3.2.2	Gaz du sang	76
3.3	Etude A6 : Paramètres respiratoires lors des épreuves d'hypercapnie et d'hypoxie exogènes.....	76
3.3.1	Hypercapnie exogène	76
3.3.1.1	Signes cliniques.....	76
3.3.1.2	Paramètres respiratoires	76
3.3.2	Hypoxie exogène.....	77
3.3.2.1	Signes cliniques.....	77
3.3.2.2	Paramètres respiratoires	78
4	Etude A7 : Acides organiques sériques artériels et veineux	78
Chapitre 3 : études des effets respiratoires de l'association du Δ -9-tétrahydrocannabinol et de l'éthanol.....		82
1	Etude B1 : Paramètres respiratoires lors de la co-administration d'éthanol et d'une dose sans effet respiratoire de THC	82
1.1	Signes cliniques.....	82
1.2	Paramètres respiratoires	84
2	Etude B2 : Paramètres respiratoires lors de la co-administration d'éthanol et d'une dose de THC provoquant par elle-même une variation des paramètres respiratoires.....	87
2.1	Signes cliniques.....	87
2.2	Paramètres respiratoires	89
Chapitre 4 : études des effets respiratoires de l'acide γ -hydroxybutyrique		93
1	Etude C1 : Détermination de la DL ₅₀	93
2	Etude C2 : Cinétiques sanguines artérielles du GHB.....	93
3	Paramètres respiratoires	98
3.1	Etude C3 : Paramètres respiratoires en ventilation de repos.....	98
3.1.1	Signes cliniques.....	98
3.1.2	Paramètres respiratoires	100

3.2	Etude C4 : Gaz du sang en ventilation de repos.....	108
3.2.1	Signes cliniques.....	108
3.2.2	Gaz du sang	109
3.3	Etude C5 : Paramètres respiratoires lors des hypercapnies exogènes.....	111
3.3.1	Signes cliniques.....	111
3.3.2	Paramètres respiratoires	112
Chapitre 5 : études des effets respiratoires de l'association acide γ -hydroxybutyrique et l'éthanol.....		116
1	Paramètres respiratoires	116
1.1	Etude D1 : Paramètres respiratoires lors de la co-administration d'éthanol et d'une dose de GHB ne provoquant pas de respiration de type apneustique	116
1.1.1	Signes cliniques.....	116
1.1.2	Paramètres respiratoires	119
1.2	Etude D2 : Paramètres respiratoires lors de la co-administration d'éthanol et d'une dose de GHB provoquant par elle-même une respiration de type apneustique ...	122
1.2.1	Signes cliniques.....	122
1.2.2	Paramètres respiratoires	125
2	Etude D3 : Cinétiques sanguines veineuses du GHB et de l'éthanol après leur administration simultanée	134
Chapitre 6 : Discussion		137
1	Ethanol	140
1.1	Cinétiques sanguines de l'éthanol et des acides organiques	142
1.2	Effets de l'éthanol	152
1.3	Modèle.....	161
2	Association de l'éthanol et du THC	164
2.1	Effets du THC	166
2.2	Effet de l'association de l'éthanol et du THC	172
2.3	Modèle.....	178
3	Acide gamma hydroxybutyrique.....	180
3.1	Cinétiques sanguines du GHB.....	184
3.2	Effets du GHB	189
3.3	Modèle.....	196
4	Association de l'éthanol et du GHB.....	202
4.1	Cinétiques sanguines de l'éthanol et du GHB.....	202
4.2	Effets de l'association de l'éthanol et du GHB	204

4.3	Modèle.....	209
	Bibliographie	216

Abréviations

1,4-BD	1,4 butanediol
A _I	Durée des apnées inspiratoires
A _E	Durée des apnées expiratoires
AMPA	Récepteur au glutamate sensible à l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole
ANOVA-1	Analyse de variance à un facteur
ANOVA-2	Analyse de variance à deux facteurs
AUC(s)	Aire(s) sous la courbe
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BSTFA	N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
°C	Degré Celsius
CAS	Numéro de registre Chemical Abstract Service
CB ₁	Récepteur aux cannabinoïdes de type 1
CB ₂	Récepteur aux cannabinoïdes de type 2
CHC	α -cyano-4-hydroxycinnamate
Cl	Clairance
CL/F _{IP}	Clairance apparente après administration intrapéritonéale
C _{max}	Concentration maximale observée
CPG/DIF	Chromatographe en phase gazeuse à détection par ionisation de flamme

CPG/SM/SM Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse en tandem

CYP(s) Cytochrome (s) P450

DL₅₀ Dose létale médiane

EEG Electroencéphalogramme

ET/CPG/DIF Chromatographe en phase gazeuse à détection par ionisation de flamme et injecteur à espace de tête

F Fréquence respiratoire

F_{IP} Biodisponibilité intrapéritonéale

g Gramme

GABA Acide gamma-aminobutyrique

GABA_A Récepteur au GABA de type A

GABA_B Récepteur au GABA de type B

GBL Gamme butyrolactone

GHB Acide gamma-hydroxybutyrique

GHB-D₆ Acide 4-hydroxy-2,2,3,3,4,4-hexadeuterobutyrique

H⁺ Cation hydrogène ou proton

IM Voie intramusculaire

IP Voie intrapéritonéale

IV Voie intraveineuse

ka Constante d'absorption

Kd	Constante de dissociation
Ki	Constante d'inhibition
Km	Constante de Michaelis
L	Litre
MCT	Transporteur de monocarboxylate : MonoCarboxylate Transporter
MEOS	Système mitochondrial d'oxydation de l'éthanol : Mitochondrial Ethanol-Oxidizing System
min	Minutes
m	Mètre
M	mol.L ⁻¹
mol	Mole
NA	Non apprécié(e)
NaGHB	Gamma-hydroxybutyrate de sodium
NMDA	Récepteur au glutamate sensible au N-méthyl-D-aspartate
NS	Non significatif
PaCO ₂	Pression artérielle en dioxyde de carbone
PaO ₂	Pression artérielle en oxygène
RSE	Erreur-type relative (Relative Standard Error)
s	Seconde
SD	Ecart type (Standard Deviation)
SEM	Erreur standard de la moyenne (Standard Error of the Mean)

SMCT	Transporteur de monocarboxylate couplé au sodium : Sodium MonoCarboxylate Transporter
SNC	Système nerveux central
SSA	Semi-aldéhyde succinique
T _E	Temps expiratoire
T _{EC}	Temps expiratoire corrigé
THC	Δ -9-tétrahydrocannabinol
T _I	Temps inspiratoire
T _{IC}	Temps inspiratoire corrigé
T _{max}	Temps d'apparition de la concentration maximale
TMS	Dérivé triméthylsilylé
TMCS	Triméthylchlorosilane
TRPV1	Récepteur à la vanilloïde de classe 1 (Transient Receptor Potential Vanilloïd)
T _{TOT}	Temps total
V	Volt
V _d	Volume de distribution
V _d /F _{IP}	Volume de distribution apparent après administration intrapéritonéale
V _E	Volume minute (volume total respiré par minute)
V _{max}	Vitesse maximale
VT	Volume courant

Introduction

La consommation, dite récréative, de substances psychoactives, est un fait avéré dans nos sociétés. Elle a pour but, dans un contexte souvent festif, de désinhiber l'utilisateur. Les substances employées, qu'elles soient stupéfiantes, psychotropes ou vénéneuses, licites ou illicites, exposent alors le consommateur à des effets recherchés : augmentation de l'empathie, excitation, hallucinations, anxiolyse, ébriété, mais aussi parfois à des effets subis voire préjudiciables, comme la toxicité. Cette dernière est alors le fait soit de la substance seule, par exagération de ses effets lors d'un surdosage, soit de plusieurs principes actifs associés au cours d'une polyconsommation.

Plusieurs types de polyconsommations peuvent être distingués. Quand les substances sont consommées simultanément ou dans un laps de temps relativement court, on parle de polyconsommation concomitante ou d'usage concomitant. Cette situation résulte de la prise consciente de plusieurs produits dans le but de moduler leurs effets, ou de l'administration inconsciente en raison d'un mélange inconnu du consommateur dans l'unité de prise ou de la banalisation de certaines substances comme le tabac et l'alcool. L'usage concomitant expose alors le consommateur aux effets combinés des substances présentes contemporanément dans l'organisme. Quand, au cours de sa vie de consommateur, l'utilisateur a recouru à différentes substances en des périodes distinctes, on parle aussi de polyconsommation mais dans ce cas les substances ne sont pas présentes simultanément dans l'organisme (Ives and Ghelanie, 2003). La polyconsommation concerne la majorité des usagers des drogues illicites. En 2003, parmi les individus reçus dans les structures de première ligne : structures de réduction des risques (boutiques, échanges de seringues...) et structures d'accueil « à bas seuil d'exigence », les usagers de drogues déclarent avoir associé, au cours du dernier mois écoulé, à la ou les substance(s) illicite(s) consommée(s), le tabac à 92%, l'alcool à 82% et le cannabis à 85%.

Toujours en 2003, près de 60% des consommateurs de substances illicites déclarent consommer plusieurs produits prohibés. Face à l'étendue du phénomène, dès 2002, l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques rapportait la nécessité de prendre en considération cette polyconsommation, surtout que les combinaisons possibles sont multiples et que leurs effets délétères ne sont pas tous connus (Cabal, 2002). Le Pr. Jean-Pol Tassin, directeur de recherche à l'INSERM notait déjà en 1999 : « Une autre difficulté est celle qui est liée aux mélanges. La communication sur le haschich n'a pas de sens s'il est fait abstraction de ses éventuels mélanges avec l'alcool. Cette observation est également valable pour les opiacés qui offrent des possibilités de mélanges infiniment plus toxiques que le produit seul. » (Tassin, 2000).

Ainsi, dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé de décrire et d'étudier les effets respiratoires d'association de substances récréatives, la description des phénomènes et mécanismes toxiques pouvant aider la prise en charge médicale de patients intoxiqués. Les associations candidates à cette étude étaient nombreuses. Nous avons choisi de nous focaliser sur deux associations, dont les conséquences respiratoires n'avaient pas ou peu été rapportées, alors que les substances isolées sont identifiées comme inductrices de modifications respiratoires.

~ ~ 0 ~ ~

Devant sa prévalence de consommation et d'association à d'autres substances récréatives, l'éthanol est le dénominateur commun à chacun des mélanges testés. Il a donc été testé isolément avec notre modèle, d'autant que certains auteurs lui ont attribué une action sur la respiration. A faible dose, l'éthanol serait stimulant et à forte dose dépresseur de la ventilation de repos, chez l'homme (Higgins, 1917, Hitchcock, 1942, Johnstone and Witt, 1972, Johnstone and Reier, 1973) et chez les mammifères (Loomis, 1952, Klingman et coll.,

1958, Kettunen et coll., 1983, Brackett et coll., 1994, Pagala et coll., 1995). Mais aucune étude des effets respiratoires de l'éthanol sur l'animal adulte ou l'homme, par pléthysmographie corps entier, n'a été rapportée dans la littérature.

La description de ses effets respiratoires propres était nécessaire puisque l'éthanol est connu pour potentialiser l'effet de certaines substances déprimeurs du système nerveux central (SNC) comme les benzodiazépines, les carbamates ou de certaines analgésiques comme les opiacés (Seixas, 1975, Mezey, 1976).

~ ~ o ~ ~

La première association envisagée a été celle du Δ -9-tétrahydrocannabinol (THC), principe actif du *Cannabis sativa* à l'éthanol.

Le cannabis est la substance illicite la plus consommée en France. En 2010, ses expérimentateurs, parmi les 14-75 ans (49 millions de personnes), ont été estimés à 13,4 millions, dont 1,2 million d'usagers réguliers (10 consommations par semaine) et 550 000 usagers quotidiens (Beck et coll., 2011). Son association à l'éthanol est l'une des plus répandue. En 2000, parmi les 18,9 % des 18-44 ans déclarant avoir fait un usage concomitant d'au moins deux substances parmi l'alcool, le tabac et le cannabis, 88,5 % avaient mélangé l'alcool et le cannabis (Beck et coll., 2001, OFDT, 2005b, 2005a).

Si certains effets de cette association ont été investigués, tant chez l'homme que sur des modèles animaux :

- effets sur l'induction du sommeil (Forney, 1971) ;
- la mémoire (Ciccocioppo et coll., 2002) ;
- le rythme cardiaque (Kiplinger and Manno, 1971, Pryor et coll., 1977) ;
- l'humeur ou le ressenti des effets (Lukas and Orozco, 2001, Liguori et coll., 2002) ;

- la coordination motrice, l'équilibre ou la conduite automobile (Pryor et coll., 1977, Perez-Reyes et coll., 1988, Dar, 2000, Liguori et coll., 2002, Ronen et coll., 2010) ; ou
- les phénomènes de tolérance croisée (Pryor et coll., 1977, da Silva et coll., 2001, Wright and Terry, 2002, Lemos et coll., 2007) ;

le rôle délétère des associations de l'alcool avec le THC n'a pas été exploré dans ses conséquences respiratoires. Or, les agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes, dont le THC, ont des effets respiratoires assez marqués chez les mammifères (Harris, 1971, Graham and Li, 1973, Li, 1973, Doherty et coll., 1983, Schmid et coll., 2003, Pfitzer et coll., 2004). Ces effets ont d'ailleurs été confirmés chez le rat non anesthésié par notre équipe (Duarte et coll., 2010).

~ ~ o ~ ~

La seconde association envisagée a été celle de l'acide γ -hydroxybutyrique (GHB) à l'éthanol.

Le GHB, substance endogène du cerveau des mammifères, est un métabolite de l'acide γ -aminobutyrique (GABA). La synthèse et les propriétés pharmacologiques du GHB ont été décrites par Henri Laborit et son équipe au début des années 60 (Laborit et coll., 1960, Laborit, 1964). Depuis 1961, année de sa première autorisation de mise sur le marché, le GHB est utilisé en médecine humaine. De nos jours, il est employé, en France, comme adjuvant d'anesthésie, sédatif ou dans le traitement de la narcolepsie.

Depuis la fin des années 1980, son usage a été détourné par des culturistes pour son action alléguée sur l'hormone de croissance et par des consommateurs de substances récréatives pour ses propriétés euphorisantes (Abanades et coll., 2007). Enfin, parce qu'il provoque relaxation, ébriété, somnolence et amnésie, il est employé à des fins criminelles (viols, vols) comme agent de soumission chimique (Deveaux, 2002).

Il existe deux précurseurs du GHB : la γ -butyrolactone (GBL) et le 1,4 butanediol (1,4-BD) qui sont métabolisés en GHB après absorption. Comme ces substances ont de nombreuses applications industrielles, elles ne sont pas classées parmi les stupéfiants. Bien que leur vente à l'état pur ait été restreinte, elles restent disponibles et font l'objet d'une consommation récréative en substitution du GHB, qui est classé stupéfiant. Leur activité correspondant à celle du GHB formé, il est alors difficile de distinguer leur consommation, bien que l'étape préliminaire de formation du GHB module les cinétiques et les effets observés.

La prévalence de l'usage du GHB comme drogue récréative, moins de 1% en France, est bien moindre que celle du *Cannabis*, même en y incluant ses deux précurseurs GBL et 1,4-BD, qui sont d'ailleurs encore parfois vendus comme étant du GHB. Mais depuis 2003, cette prévalence augmente, et dans certaines sous-populations, lors de certains événements ou dans certaines zones géographiques, elle a pu atteindre jusqu'à 19 %. En comparaison à la faible diffusion du GHB et ses précurseurs, leurs conséquences sanitaires sont importantes tant dans l'accroissement du nombre de prises en charge médicale que dans le nombre de décès (Persson et coll., 2001, Zvosec et coll., 2001, Kintz et coll., 2005, Mazarr-Proo and Kerrigan, 2005, Hillebrand et coll., 2008, Cadet-Taïrou and Gandilhon, 2009, Zvosec et coll., 2009, Knudsen et coll., 2010, Chèze et coll., 2012).

Le GHB est un dépresseur du SNC. Cette propriété est d'ailleurs mise à profit pour certaines de ces applications médicales, mais il module aussi la respiration et peut provoquer une dépression respiratoire (Laborit, 1964, Lund et coll., 1965, Morse et coll., 2012b) à l'origine de nombreux décès parmi ceux rapportés (Anonyme, 1997a, Anonyme, 1997b, Li et coll., 1998, Ingels et coll., 2000, Timby et coll., 2000, Mason and Kerns, 2002, Caldicott et coll., 2004, Liechti and Kupferschmidt, 2004, Strickland et coll., 2005, Zvosec et coll., 2011).

De plus l'éthanol lui est souvent associé lors des consommations récréatives (Chin et coll., 1998, Li et coll., 1998, Degenhardt et coll., 2003, Boyd et coll., 2012).

~ ~ o ~ ~

Nous rapportons donc l'étude des effets respiratoires de substances récréatives et de certaines de leurs associations par pléthysmographie corps entier du rat mâle Sprague-Dawley âgé de 7 à 9 semaines, soit de jeunes adultes. Cette technique permet, sur ce modèle animal non anesthésié et non contraint de décrire finement les paramètres respiratoires en ventilation de repos, mais aussi lors d'épreuves d'hypercapnie ou d'hypoxie exogènes intermittentes par exemple.

~ ~ o ~ ~

A partir de ce modèle animal, par ailleurs déjà éprouvé lors de l'étude des effets respiratoires de certains opiacés, nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

- L'éthanol provoque-t-il une modification de la respiration à faible ou forte dose ?
- Lors de son association au THC, les effets respiratoires de ce dernier sont-ils modifiés ? Le cas échéant, existe-t-il une potentialisation, inhibition ou addition des effets ?
- Les effets respiratoires du GHB peuvent-ils être précisés par l'emploi de la pléthysmographie corps entier ?
- L'éthanol administré concomitamment au GHB modifie-t-il les effets de celui-ci ? Le cas échéant, y a-t-il potentialisation, inhibition ou addition des effets ? Cette potentielle interaction a-t-elle une origine pharmacocinétique ou pharmacodynamique ?

Chapitre 1 : matériels, techniques et méthodes

Toutes les expérimentations ont été menées dans le respect des règles éthiques applicables à l'expérimentation animale décrites dans la directive 86/609/CEE du conseil du 24 novembre 1986 et le décret du 20 Octobre 1987 (87-848/EEC). Cette directive inclut les dispositions législatives, réglementaires et administratives des états membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.

Chaque étude a fait l'objet d'un protocole déposé au près du Comité d'Ethique Animale, de la Faculté de Pharmacie de Paris et approuvé par celui-ci sous les références : n° P2.FB.066.09, P2.FB.094.09, P2.FB.134.10, P2.FB.135.10, P2.FB.147.10, CEEA34.FB.025.11 et CEEA34.FB.044.12.

1 Matériels

1.1 Animaux

Toutes les expérimentations ont été menées avec des rats mâles Sprague-Dawley (Janvier, Le Genest-Saint Isle, France), âgés de 7 à 9 semaines et pesant entre 250 et 350 grammes aux moments de la manipulation. A leur livraison, les animaux sont placés en acclimatation pour une semaine avant toute manipulation. Pendant leur séjour à l'animalerie, ils sont maintenus dans des conditions adaptées à leur poids (taille des boîtes et nombre d'individus par boîte), à température constante (20-21 °C) en respectant un cycle circadien de 12h (lumière/obscurité 12h/12h). L'eau de boisson et la nourriture standardisée sont disposées *ad libitum*. A la fin de chaque expérience, les animaux survivants sont euthanasiés par une surdose intrapéritonéale de pentobarbital.

1.2 Réactifs

1.2.1 Anesthésiques et médicaments

Trois anesthésiques différents ont été utilisés : la kétamine (CAS 6740-88-1) (Clorketam®, Vetoquinol®, Lure), la xylazine (CAS 7361-61-7) (Rompun®, Bayer-Pharma® Santé Animale, Puteaux) et le pentobarbital (CAS 76-74-4) (Pentobarbital sodique, Ceva® Santé Animal, Libourne). L'héparine (CAS 9005-49-6) (Héparine Choay®, Sanofi Aventis, Paris) est diluée dans du chlorure de sodium isotonique 0,9% (CAS 7647-14-5) (Fresenius Kabi® France, Sèvres).

1.2.2 Substances étudiées

Toutes les substances étudiées ont été administrées par voie intrapéritonéale à un volume de 10 mL.kg⁻¹.

1.2.2.1 Ethanol

- **Dose létale médiane (DL₅₀)**

Les solutions éthanoliques destinées à la détermination de la dose létale médiane sont fabriquées par dilution d'éthanol Rectapur® 99,9% (CAS 64-17-5) (VWR International®, Fontenay sous bois) dans du chlorure de sodium isotonique 0,9% injectable ou dans la solution de solubilisation du THC, selon le tableau suivant :

Tableau 1 : Constitution des solutions d'éthanol destinées à la détermination de la dose létale médiane

Dose (g.kg ⁻¹)	2,56	2,96	3,33	3,41	3,85
Concentration cible (g.L ⁻¹)	256	296	333	341	385
Dilution (v/v)	8/25 ^{ème}	37/100 ^{ème}	333/800 ^{ème}	341/800 ^{ème}	385/800 ^{ème}
Concentration finale à 20°C calculée (g.L ⁻¹)	260	301	339	348	393
Erreur (%)	+1,37	+1,72	+1,93	+1,97	+2,10

Dose (g.kg ⁻¹)	4,33	4,44	5,00	5,77	7,50
Concentration cible (g.L ⁻¹)	433	444	500	577	750
Dilution (v/v)	433/800 ^{ème}	111/200 ^{ème}	5/8 ^{ème}	577/800 ^{ème}	15/16 ^{ème}
Concentration finale à 20°C calculée (g.L ⁻¹)	442	453	510	586	748
Erreur (%)	+2,13	+2,13	+1,99	+1,61	-0,31

Pour la dose à 9,75 g.kg⁻¹, la densité de l'éthanol ne permettant pas de fabriquer une solution à 975 g.L⁻¹, la solution à 750 g.L⁻¹ a été administrée à 13,3 mL.kg⁻¹.

Les calculs de dilution de l'éthanol absolu ont été établis en considérant la densité de l'éthanol comme égale à 0,8 et la concentration d'éthanol égale à 100 %. Les concentrations finales ont été calculées pour une température de 20°C en considérant la contraction de volume et les densités des solutions alcooliques non arrondies. L'erreur engendrée varie entre ±2,5 % et reste bien inférieure aux erreurs liées aux dilutions et à l'injection. Cette erreur est considérée comme acceptable.

- **Autres études**

Les solutions éthanoliques destinées aux études cinétiques et respiratoires sont fabriquées par dilution d'éthanol Rectapur® 99,9% dans du chlorure de sodium isotonique 0,9% injectable, selon le tableau suivant :

Tableau 2 : Constitution des solutions d'éthanol destinées aux études cinétiques et respiratoires

Dose (g.kg ⁻¹)	0,125	0,25	0,5	1	1,5	3	4,5
Concentration cible (g.L ⁻¹)	12,5	25	50	100	150	300	450
Dilution (v/v)	1/64 ^{ème}	1/32 ^{ème}	1/16 ^{ème}	1/8 ^{ème}	3/16 ^{ème}	3/8 ^{ème}	9/16 ^{ème}
Concentration finale à 20°C calculée (g.L ⁻¹)	12,3	24,7	49,5	99,5	150	305	460
Erreur (%)	-1,53	-1,22	-1,06	-0,51	+1,46	+1,75	+2,11

Les calculs de dilution et les concentrations ont été établis comme précédemment décrit.

L'erreur engendrée reste inférieure aux erreurs liées aux dilutions, à l'injection et au dosage.

Cette erreur est considérée comme acceptable.

1.2.2.2 *Δ9-tétrahydrocannabinol*

La solution de Tween 80 (CAS 9005-65-6) (Sigma-Aldrich®, St Quentin Fallavier, France) à 5% v/v dans le chlorure de sodium injectable est fabriquée par dilution au 20^{ème}, elle est utilisée comme solvant de dilution pour les solutions de Δ9-tétrahydrocannabinol (THC).

Les solutions de THC destinées aux études respiratoires sont fabriquées par dilution d'une solution éthanolique à 28 g.L⁻¹ de THC (CAS 1972-08-3) (Sigma-Aldrich®, St Quentin Fallavier, France) dans le solvant de dilution selon le tableau suivant :

Tableau 3 : Constitution des solutions de THC destinées aux études respiratoires

Dose (mg.kg ⁻¹)	3	8,4
Concentration cible (mg.L ⁻¹)	300	840
Dilution (v/v)	3/280 ^{ème}	3/100 ^{ème}

La solution à 28 mg.mL⁻¹ de THC étant éthanolique, les mélanges administrés contiennent de l'alcool, au maximum 3% vol. (soit 23,7 g.L⁻¹), équivalent à une dose de 0,237 g.kg⁻¹. Ainsi, la solution administrée aux animaux du groupe Témoin sera constituée d'une dilution au 3/100^{ème} d'éthanol dans le solvant de dilution.

Les solutions mixtes de THC et d'éthanol sont obtenues par dilution de la solution éthanolique de THC et de l'éthanol Rectapur® dans la solution de dilution selon le tableau suivant :

Tableau 4 : Constitution des solutions mixtes de THC et d'éthanol destinées aux études respiratoires

Dose (mg.kg ⁻¹) de THC	3	8,4	8,4
Concentration cible (mg.L ⁻¹) en THC	300	840	840
Dilution (v/v) du THC	3/280 ^{ème}	48/1600 ^{ème}	48/1600 ^{ème}
Dose (g.kg ⁻¹) d'éthanol	1	1	3
Concentration cible (g.L ⁻¹) en éthanol	100	100	300
Dilution (v/v) de l'éthanol Rectapur®	32/280 ^{ème}	152/1600 ^{ème}	552/1600 ^{ème}
Concentration finale en éthanol à 20°C calculée (g.L ⁻¹)	99,5	99,5	305

Comme indiqué précédemment, les titres alcooliques sont entachés d'une erreur considérée comme acceptable.

1.2.2.3 Acide γ -hydroxybutyrique

- **Dose létale médiane**

Trois solutions concentrées sont fabriquées par dissolution de γ -hydroxybutyrate de sodium (NaGHB) (CAS 502-85-2) (Sigma Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier) dans de l'eau pour préparation injectable à 200, 300 et 373 g.L⁻¹ de GHB (CAS 591-81-1). Les solutions de GHB destinées à la détermination de la dose létale médiane sont obtenues par dilution de ces solutions dans du chlorure de sodium isotonique 0,9%, selon le tableau suivant :

Tableau 5 : Constitution des solutions de GHB destinées à la détermination de la dose létale médiane

Dose (mg.kg ⁻¹)	1122	1308	1459	1700	1896	1962	2210	2550	2873	3315
Concentration cible (g.L ⁻¹)	112,2	130,8	145,9	170,0	189,6	196,2	221,0	255,0	287,3	331,5
Dilution (v/v) de la solution à 200 g.L ⁻¹	561/1000 ^{ème}	327/500 ^{ème}	729/1000 ^{ème}	17/20 ^{ème}	237/250 ^{ème}	981/1000 ^{ème}				
Dilution (v/v) de la solution à 300 g.L ⁻¹							737/1000 ^{ème}	850/1000 ^{ème}	958/1000 ^{ème}	
Dilution (v/v) de la solution à 373 g.L ⁻¹										889/1000 ^{ème}

- **Etudes cinétiques et respiratoires**

Les solutions de GHB destinées aux études cinétiques et respiratoires sont obtenues par dilution de Gamma-OH® (Serb®, Paris) dans du chlorure de sodium isotonique 0,9% injectable, selon le tableau suivant :

Tableau 6 : Constitution des solutions de GHB destinées aux études cinétiques et respiratoires

Dose (mg.kg ⁻¹)	100	300	600	1000	1600
Concentration cible (g.L ⁻¹)	10	30	60	100	160
Dilution (v/v)	1/20 ^{ème}	3/20 ^{ème}	3/10 ^{ème}	1/2	4/5 ^{ème}

- **Etudes cinétiques et respiratoires de l'association de l'éthanol et du GHB**

Les solutions mixtes de GHB et d'éthanol sont obtenues par dilution du Gamma-OH® et de l'éthanol Rectapur® dans du chlorure de sodium isotonique 0,9% injectable, selon le tableau suivant :

Tableau 7 : Constitution des solutions mixtes de GHB et d'éthanol destinées aux études cinétiques et respiratoires

Dose (mg.kg ⁻¹) de GHB	300	300	600	600
Concentration cible (g.L ⁻¹) en GHB	30	30	60	60
Dilution (v/v) du Gamma-OH	24/160 ^{ème}	24/160 ^{ème}	48/160 ^{ème}	48/160 ^{ème}
Dose (g.kg ⁻¹) d'éthanol	1	3	1	3
Concentration cible (g.L ⁻¹) en éthanol	100	300	100	300
Dilution (v/v) de l'éthanol Rectapur®	20/160 ^{ème}	60/160 ^{ème}	20/160 ^{ème}	60/160 ^{ème}

Comme indiqué précédemment, les titres alcooliques sont entachés d'une erreur considérée comme acceptable.

1.2.2.4 Conservation des solutions

Les solutions destinées à être administrées aux animaux ont été préparées extemporanément ; les solutions concentrées ont été conservées au froid positif (+4°C) pendant une période maximale d'un mois. Les substances et solutions originelles sont conservées selon les

recommandations en vigueur : température ambiante pour le GHB, le NaGHB, l'éthanol, le chlorure de sodium isotonique et le Tween 80, froid négatif (-20°C) et à l'abri de la lumière pour le THC.

1.2.3 Réactifs de dosage

1.2.3.1 *Ethanol*

Le tert-butanol (CAS 75-65-0) (Sigma Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier) dissout dans de l'eau ultrapure à 200 mg.L⁻¹ est employé comme étalon interne pour le dosage de l'éthanol sanguin. L'eau ultrapure (CAS 7732-18-5) est produite par une centrale Milli-Q gradient A10 équipée d'une cartouche Quantum EX ; l'eau produite a une résistivité de 18,2 Mohms.cm⁻¹ (Millipore®, Molsheim). Le chlorure de sodium en poudre (CAS 7647-14-5) employé est de qualité pour analyses (VWR International®, Fontenay-sous-bois). La gamme d'étalonnage est constituée par un « Cerilliant Multi-component alcohol calibration kit » et les contrôles internes par les : « Medidrug Ethanol VB-plus 0.5 g.L⁻¹ » et « Medidrug Ethanol VB-plus 1.1 g.L⁻¹ » (LGC Standards®, Molsheim).

1.2.3.2 *Acide γ -hydroxybutyrique*

La solution standard de GHB à 500 mg.L⁻¹ est fabriquée par dissolution de NaGHB (Sigma Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier) dans de l'eau ultrapure. La solution méthanolique d'acide 4-hydroxy-2,2,3,3,4,4-hexadeutérobutyrique (GHB-D₆) (CAS 362049-53-4) à 100 mg.L⁻¹ (LGC Standards®, Molsheim) est diluée à 20 mg.L⁻¹ dans du méthanol EMSURE® pour analyses (CAS 67-56-1) (VWR International®, Fontenay sous bois). L'acétonitrile HiPerSolv CHROMANORM® grade gradient pour CLHP (CAS 75-05-8) et le N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) (CAS 25561-30-2) + 1% de

triméthylchlorosilane (TMCS) (CAS 75-77-4) sont acquis auprès de VWR International® (Fontenay sous bois).

1.2.3.3 Acides organiques

Les acides organiques sont dosés à l'aide de la trousse Anion Analyses Kit® (Ref. A53537, Beckman Coulter, Villepinte).

1.2.4 Gaz

L'air comprimé utilisé en pléthysmographie est produit par des équipements d'infrastructure sur le site de la Faculté de Pharmacie. Le mélange hypoxique, composé de 12 % d'oxygène dans l'azote, et le mélange hypercapnique, composé de 5 % de dioxyde de carbone et 21 % d'oxygène dans l'azote, sont produits par la société Air Products (Paris).

Les gaz nécessaires (Messer®, Puteaux), au fonctionnement des chromatographes sont soit mis à disposition en bouteilles (Hélium pureté 5.5), soit produits *in situ* :

- Hydrogène : générateurs d'hydrogène Parker domnick hunter® 60H-MD, pureté > 99,999 % ;
- Air comprimé : compresseurs Atlas Copco® SF4 et sécheurs d'air Parker domnick hunter® LGCAD300, qualité d'air obtenue ISO 8573-1 class 1.2.1, teneur en hydrocarbures < 0,01 ppm.

1.3 Matériels

1.3.1 Consommables et petits matériels

Les boîtes de contention (Harvard Apparatus®, Les Ulis), cylindriques en plexiglas, ont un diamètre interne de 6,5 cm. L'espace réservé à l'animal est ajustable en longueur jusqu'à 20

cm. Ces boîtes sont percées de nombreuses ouvertures pour faciliter la respiration (Gueye et coll., 2002).

Les cathéters artériels sont fabriqués avec de la tubulure SILASTIC® (Dow Corning®, Seneffe, Belgique), d'un diamètre externe de 0,94 mm, interne de 0,51 mm et d'une longueur de 30 cm. Des cathéters courts Introcan® de 22 G (Robé Médical®, Remiremont) sont utilisés pour le cathétérisme de la veine caudale. Lors de la cathétérisation artérielle, l'artère est ligaturée avec du fil de soie non résorbable Mersilk® ; l'abdomen est suturé à l'aide de deux types de fils, un fil résorbable Coated Vicryl® et un fil non résorbable Mersutures®. Tous ces fils chirurgicaux sont produits par Ethicon® (Issy les Moulineaux).

Les volumes supérieurs à 1 mL sont administrés avec une seringue de 5 mL équipée d'une aiguille de 23 G x 25 mm, pour les volumes inférieurs, une seringue de 1 mL équipée d'une aiguille de 25 G x 25 mm est utilisée. Tout le matériel d'injection est de marque Terumo® (Gyancourt). Les microtubes de recueil des prélèvements sanguins sont des Eppendorf Safe-Lock Tubes® de 1,5 ou 0,5 mL (VWR International®, Fontenay sous bois).

Lors du recueil des échantillons sanguins, les capillaires, tubes et flacons utilisés sont à usage unique et de taille adaptée au contenu et aux appareils.

Les instruments de chirurgie, la verrerie de laboratoire et les micropipettes automatiques utilisés sont mis à disposition par l'Institut, l'Unité ou l'Animalerie. Ces matériels sont employés, nettoyés, qualifiés et contrôlés selon les règles et les normes en vigueur.

1.3.2 Equipements

1.3.2.1 Appareil à gaz du sang

L'appareil utilisé est un Bayer Rapidlab 248™ (Siemens Healthcare Diagnostic, Saint-Denis).

1.3.2.2 Pléthysmographie

L'appareillage est constitué de :

- deux enceintes en plexiglas d'une capacité de 2,8 L chacune ou de 4 L chacune, balayées par un flux d'air à 7 L.min^{-1} ;
- le dispositif de détection des variations de la pression est composé d'un transducteur de différentiel de pression Validyne DP103-10 et d'un démodulateur soit de type Validyne CD16, soit de type Validyne CD15 (Kener Instrumentation®, Richebourg), il traduit les variations de pression mesurées en signal électrique quantifiable ;
- deux flacons-laveurs (VWR International®, Fontenay sous bois) en série pour saturer l'air comprimé en eau ;
- d'une source d'air comprimé (matériel d'infrastructure).

Les chambres, le capteur, les flacons laveurs et les sources de gaz sont reliés par des tuyaux en silicone Versilic® de diamètre externe 12 mm et interne 6 mm (Dominique DUTSCHER, Brumath). Les chambres sont reliées entre elles par deux connections : d'un part *via* le capteur différentiel de pression et d'autre part par un tuyau disposant d'une restriction. Cette dernière permet l'équilibration progressive des températures et des pressions sans interférer avec l'enregistrement du signal.

Pour les épreuves d'hypercapnie et d'hypoxie exogènes intermittentes, les bouteilles (type X05S) de mélange gazeux et les détendeurs-débitlitres DYNABLOC 5L type C employés proviennent de la société Air Products (Paris), le débit d'air est alors substitué par celui du mélange gazeux à 3 L.min^{-1} .

1.3.2.3 Analyseur O_2 - CO_2

L'analyseur d'atmosphère est un VIGAZ GOLF 120 (Visciano, Saint Genis Pouilly).

1.3.2.4 Dispositif de radiotélémétrie

Le système employé est composé d'un receveur PhysioTel® RPC-1, d'un baromètre APR-1, d'une matrice d'acquisition Data Exchange Matrix™ ; les sondes utilisées sont des TA10TA-F20 (Data sciences international, Les Angles), ce modèle originellement destiné aux souris est préféré au modèle pour rats plus gros et plus lourd. Ces sondes mesurent en continu la température et l'activité motrice de l'animal.

1.3.2.5 Appareils de dosage

- **Chromatographe en phase gazeuse à détecteur d'ionisation de flamme (CPG/DIF)**

Deux chromatographes ont été employés pour la détermination des éthanolémies :

- Un chromatographe 5890 (Agilent Technologies®, Massy) jusqu'à sa panne définitive ;
- Un chromatographe TRACE GC (Thermo Scientific®, Villebon sur Yvette) disposant d'un passeur d'échantillon permettant l'injection liquide ou l'injection de l'espace de tête (ET/CPG/DIF).

Ces deux appareils sont équipés d'une colonne HP BLOOD-ALCOHOL 7,5 m x 0,32 mm x 20 µm.

- **Chromatographe en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse en tandem**

L'appareil employé pour le dosage du GHB sanguin est un chromatographe 320-MS (Bruker Daltonics®, Wissembourg) équipé d'une colonne Restek RXi 5 ms 20 m x 0,18 mm x 0,18 µm (Restek®, Lisses).

- **Electrophorèse capillaire**

Le système utilisé est un P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter, Villepinte) équipé de capillaire de silice de 50 cm x 75 µm.

1.3.2.6 Autre matériel

Les balances, les centrifugeuses, les réfrigérateurs et les congélateurs utilisés sont mis à disposition par l'Institut, l'Unité ou l'Animalerie. Ces matériels sont employés, qualifiés, contrôlés selon les règles et les normes en vigueur.

1.4 Logiciels

- HP Chem Station version A.06 (Agilent Technologies®, Massy)
- Chrom-Card data system version 2.4.1 (Thermo Scientific®, Villebon sur Yvette) ;
- Bruker MS Workstation version 7.0 (Bruker Daltonics®, Wissembourg) ;
- 32 Karat™ Software version 8.0 (Beckman Coulter, Villepinte)
- Dataquest A.R.T.™ Silver analysis and Silver acquisition version 4.10 (Data sciences international, Les Angles) ;
- Elphy version 3.1.0.38 et Acquis1 version 4.0 (CNRS, Institut Alfred FRESSARD, Unité de Neurosciences intégratives et computationnelles, Gif-sur-Yvette) ;
- GraphPad Prism® version 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, Californie, USA) ;
- Monolix 4.1.2 (LIXOFT, Orsay).

2 *Techniques*

2.1 Anesthésie

Les rats ont été anesthésiés par l'association kétamine 70 mg.kg⁻¹ et xylazine 10 mg.kg⁻¹ injectée par voie intrapéritonéale. L'anesthésie est appréciée par l'immobilité complète de l'animal, la profondeur de son sommeil et l'absence de réponse à des stimulations de la queue ou des membres inférieurs.

2.2 Cathétérisme

2.2.1 Cathétérisme de l'artère fémorale

Un jour avant l'étude, l'animal est anesthésié, disposé sur un support chauffant et thermostaté (Gueye et coll., 2001). L'abord chirurgical se fait par l'aire fémorale gauche. Après dissection de la région inguinale, l'artère est isolée et cathétérisée, le cathéter est ensuite tunnellisé à la nuque par voie sous-cutanée. Après fixation, il est rincé au chlorure de sodium hépariné pour éviter toute thrombose ou obstruction de sa lumière. L'animal est alors transféré dans une cage individuelle pour une période d'au moins 24 heures, délai nécessaire à l'élimination des anesthésiques. Le jour de l'étude, l'animal est installé dans une boîte de contention. L'extrémité de recueil du cathéter est libérée, le sang est recueilli par écoulement. Au cours des études, du sérum physiologique hépariné est régulièrement injecté *via* le cathéter pour compenser les pertes liquidiennes et éviter toute thrombose.

2.2.2 Cathétérisme de la veine caudale

Le jour de l'étude, le rat est placé dans une boîte de contention. La queue de l'animal est échauffée pour provoquer une vasodilatation (eau à 40°C ou mains de l'opérateur), le cathéter

est alors introduit dans une veine à 3 cm de l'extrémité caudale. Le sang est recueilli par écoulement, en cas de vasoconstriction, un massage léger peut faciliter le recueil.

La ponction au niveau de la veine caudale latérale est une technique facile à mettre en œuvre : l'anesthésie n'est pas nécessaire, la contention suffit, le prélèvement de volume conséquent de sang est possible et les contraintes pour l'animal sont minimales (Diehl et coll., 2001).

2.3 Implantation des sondes de radiotélémétrie

Au moins quatre jours avant l'étude, l'animal est anesthésié, une laparotomie est pratiquée et le transmetteur est placé dans la cavité péritonéale (Houze et coll., 2008).

Le délai de quatre jours est nécessaire à l'animal pour récupérer son poids initial (Leon et coll., 2004). Les animaux étant pesés avant toute manipulation, ceux n'ayant pas récupéré leur poids initial au cours de ce délai, sont réservés pour une étude ultérieure.

3 Méthodes

3.1 Détermination de la dose létale médiane

La dose létale médiane (DL₅₀) a été déterminée chez le rat naïf selon la méthode « up-and-down » proposée par Dixon (Dixon, 1965, 1991) et affinée par Bruce (Bruce, 1985, 1987). Cette procédure nécessite peu d'animaux.

Après l'administration de la substance, le rat est placé dans une cage individuelle avec accès libre à la nourriture et l'eau de boisson. L'étude est menée à l'animalerie centrale dans les conditions environnementales précédemment décrites. L'animal est alors régulièrement observé à la recherche de signes de toxicité ou de la mort. Ces observations sont effectuées aux temps suivants : 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 et 240 minutes puis à 5, 6, 12 et 24 h et enfin à 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 14 jours après l'injection.

3.2 Evaluation des signes cliniques

Pour toutes les expérimentations animales, les signes cliniques ont été enregistrés selon :

1. l'échelle proposée par Pirnay et coll. (Pirnay et coll., 2008) permettant une évaluation de la conscience en quatre stades lors de l'étude des gaz du sang :
 - Stade 0 : le rat est complètement éveillé.
 - Stade 1 : diminution de l'activité locomotrice du rat qui se traduit par une diminution du tonus musculaire. Période d'éveil.
 - Stade 2 : le rat dort.
 - Stade 3 : le rat est comateux sans période d'éveil.
2. la grille de Irwin adaptée à la pléthysmographie (**Tableau 8**) pour enregistrer les signes cliniques généraux.

3.3 Gaz du sang

L'étude des gaz du sang est menée avec des rats préalablement cathétérisés au niveau de l'artère fémorale. Le jour de l'expérimentation, l'animal est placé dans une boîte de contention. Les prélèvements de sang d'un volume de 100 μ L sont analysés immédiatement avec l'analyseur des gaz du sang. Les pH, pression partielle artérielle en CO_2 (PaCO_2) et pression partielle artérielle en O_2 (PaO_2) sont mesurés par potentiométrie et ampérométrie, la concentration artérielle en bicarbonates $[\text{HCO}_3^-]$ et la saturation en oxygène SaO_2 sont calculées. Ces paramètres sont ajustés en fonction de la température de l'animal, mesurée par sonde rectale (Villa et coll., 2007).

Tableau 8 : Grille de Irwin adaptée à la pléthysmographie

	Observations	Temps de mesures			
Comportement Normal	Vigil				
	Exploration spontanée				
	Toilettage				
	Etat basal				
Observation Général	Œdème				
	Mauvaise condition				
	Moribond				
	Mort				
Système circulatoire et pelage	Erection du poil				
	Couleur de la peau				
Système respiratoire	Activité respiratoire				
	Respiration irrégulière				
Activité motrice	Activité spontanée				
	Agitation				
	Stéréotypie				
	Sédaté				
	Queue de straub				
	Convulsion				
Museau, fèces et urine	Salivation				
	Miction augmentée				
	Diarrhée/Défecation				
Conscience					
Autre					

3.4 Pléthysmographie corps entier

La pléthysmographie corps entier est une technique de physiologie respiratoire permettant de déterminer les paramètres de respiration (Bartlett and Tenney, 1970, Villa et coll., 2007, Houze et coll., 2008, Houze et coll., 2010). Le pléthysmographe utilisé mesure les temps inspiratoire (T_I) et expiratoire (T_E) et le différentiel de pression à partir des variations de pression entre la chambre de référence et la chambre où se situe l'animal. Le temps total (T_{TOT}), la fréquence respiratoire (f), le volume courant (V_T) et le volume minute (V_E) sont déterminés secondairement, leur calcul requérant les températures de l'animal et de la chambre, le volume de calibration et sa variation de pression associée et la pression atmosphérique. Enfin le débit inspiratoire moyen, V_T/T_I , et le rapport T_I/T_{TOT} , ou régime inspiratoire, sont calculés après le recueil des résultats.

La technique impose l'usage de chambres de volume constant, rigides et temporairement étanches. Les variations dans le temps de la pression sont enregistrées sur un micro-ordinateur et interprétées à l'aide des logiciels Elphy® ou Acquis1®. Chaque jour, le système est qualifié par un test de fuite et calibré par la mesure répétée des variations provoquées par la mobilisation rapide d'1 mL d'air.

L'étude est menée avec des rats équipés de sondes de radiotélémétrie. Le jour de l'étude, l'animal vigil est placé dans la chambre. Après une acclimatation d'au moins 30 minutes, l'étude débute par l'enregistrement de la respiration de repos chez l'animal encore naïf pour établir les valeurs basales. L'animal est délicatement extrait de la chambre pour l'injection puis replacé. Le décompte du temps est déclenché à l'administration de la substance et l'étude des effets de celle-ci commence. Pour chaque mesure, l'entrée et la sortie d'air sont clampées pour une durée maximale de 100 secondes, l'enregistrement est initié une fois le système clos. L'isolement du système est nécessaire à l'enregistrement des variations de pression entre les

deux chambres. Les mesures et les calculs sont établis à partir d'une plage d'au moins 20 secondes. Les paramètres sont déterminés pour chaque respiration et c'est leur moyenne qui est considérée. Le volume courant est calculé, selon l'équation de Drorbaugh et Fenn (Drorbaugh and Fenn, 1955), pour chaque temps en fonction des températures et de la pression atmosphérique relevées lors de la mesure concernée.

La mesure des variations de pression a été validée sur une gamme couvrant l'ensemble des observations (équivalent à la mobilisation de volume de 0,3 à 2,5 mL à température ambiante). Les recouvrements varient entre 99 et 103 %, les coefficients de variations de répétabilité n'excèdent pas 2,6 % et ceux de fidélité intermédiaire (anciennement reproductibilité) 3,2 %.

3.4.1 Etude en ventilation de repos

Lors de l'étude en ventilation de repos, les teneurs en O₂ et CO₂ de l'atmosphère du système ont été mesurées à respectivement :

- $20,9 \pm 0,3$ % et $0,5 \pm 0,1$ % avant la fermeture, et ;
- $20,1 \pm 0,3$ % et $1,1 \pm 0,2$ % à la réouverture.

3.4.2 Epreuves d'hypercapnie ou d'hypoxie exogènes intermittentes

Cette technique a été mise en œuvre spécifiquement pour ce travail. Lors du développement de ce modèle, il a été déterminé que l'air du système pléthysmographique était substitué par le mélange gazeux après 5 minutes à 3 L.min⁻¹. Conséquemment, les mesures ont été réalisées en deux temps : à T_{X-5 min} mesure de la respiration en air et à T_{X min} mesure en stimulation, soit hypercapnie exogène soit hypoxie exogène. L'épreuve de respiration en air consiste en la mesure de la ventilation de repos juste avant la substitution de l'air par le mélange gazeux hypercapnique ou hypoxique (*Figure 1*).

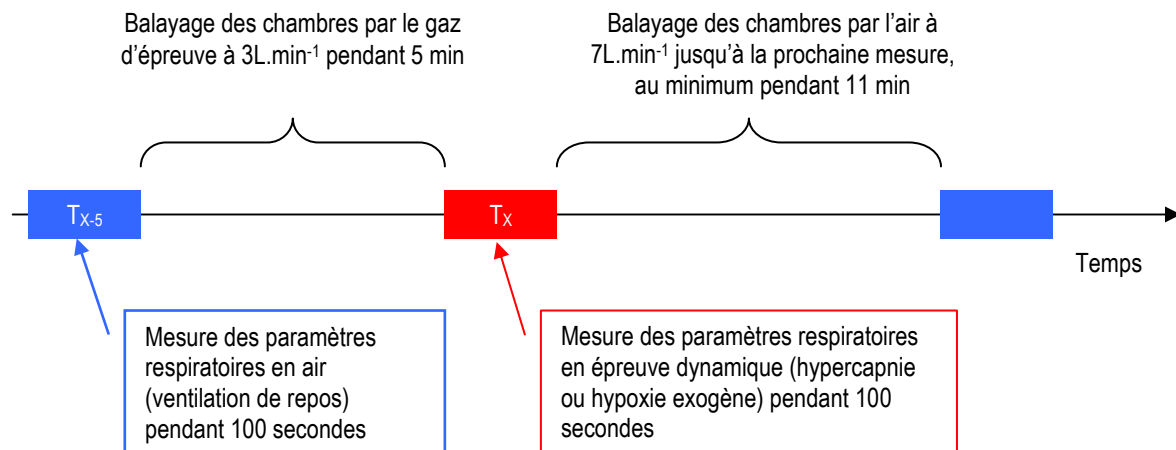


Figure 1 : Schéma du principe d'alternance des mesures en air et des mesures en stimulation

Ponctuellement au cours des expérimentations, la composition de l'atmosphère du système a été vérifiée avec l'analyseur O_2 - CO_2 . Lors des épreuves d'hypercapnie ou d'hypoxie exogènes intermittentes, les teneurs en O_2 et CO_2 de l'atmosphère du système ont été mesurées à :

- $20,9 \pm 0,3 \%$ et $4,7 \pm 0,2 \%$ avant la fermeture et $20,1 \pm 0,3 \%$ et $5,3 \pm 0,2 \%$ à la réouverture pour l'hypercapnie exogène, et ;
- $12,3 \pm 0,2 \%$ et $0,5 \pm 0,1 \%$ avant le fermeture et $11,7 \pm 0,2 \%$ et $1,1 \pm 0,2 \%$ à la réouverture pour l'hypoxie exogène.

3.4.3 Détermination des durées d'apnée

L'observation des tracés pléthysmographiques obtenus nous a incités à établir, en collaboration avec M. Sadoc, créateur du logiciel Elphy, une configuration spécifique afin de distinguer les phases inspiratoires et expiratoires véritables des pauses, que nous appelons apnées, survenant avec certaines substances. Ainsi, pour certaines études, nous avons mesuré, dans un premier temps :

- les temps inspiratoire (T_I) et expiratoire (T_E) sans correction ;

puis dans un second temps :

- les temps corrigés : temps inspiratoire corrigé (T_{IC}) et expiratoire corrigé (T_{EC}), et ;
- la durée des apnées inspiratoires (A_I) et expiratoire (A_E).

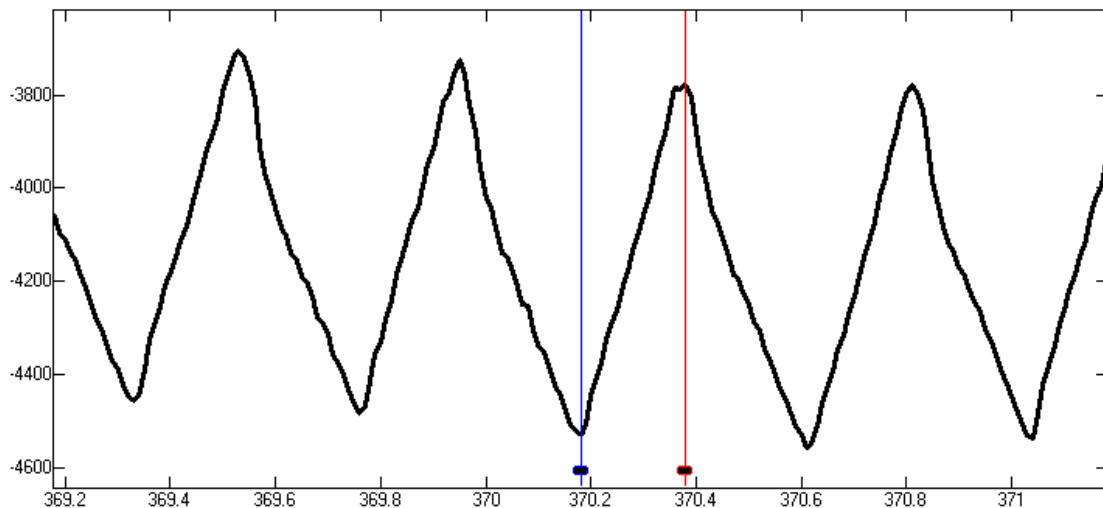


Figure 2 : Tracé pléthysmographique d'une respiration normale de rat avec les curseurs du début d'inspiration en bleu (minimum) et du début d'expiration en rouge (maximum)

Habituellement, les temps respiratoires sont calculés après détection du minimum et du maximum de variation de pression, le T_I étant le temps qui sépare le minimum du maximum et le T_E celui qui sépare le maximum du prochain minimum (*Figure 2*).

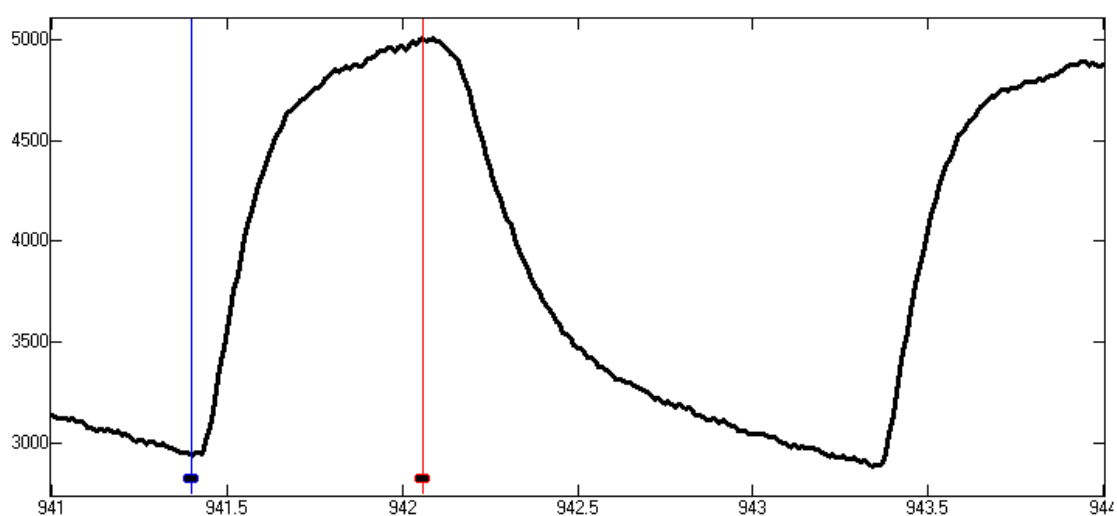


Figure 3 : Tracé pléthysmographique d'une respiration de type apneustique de rat avec les curseurs du début d'inspiration en bleu (minimum) et du début d'expiration en rouge (maximum)

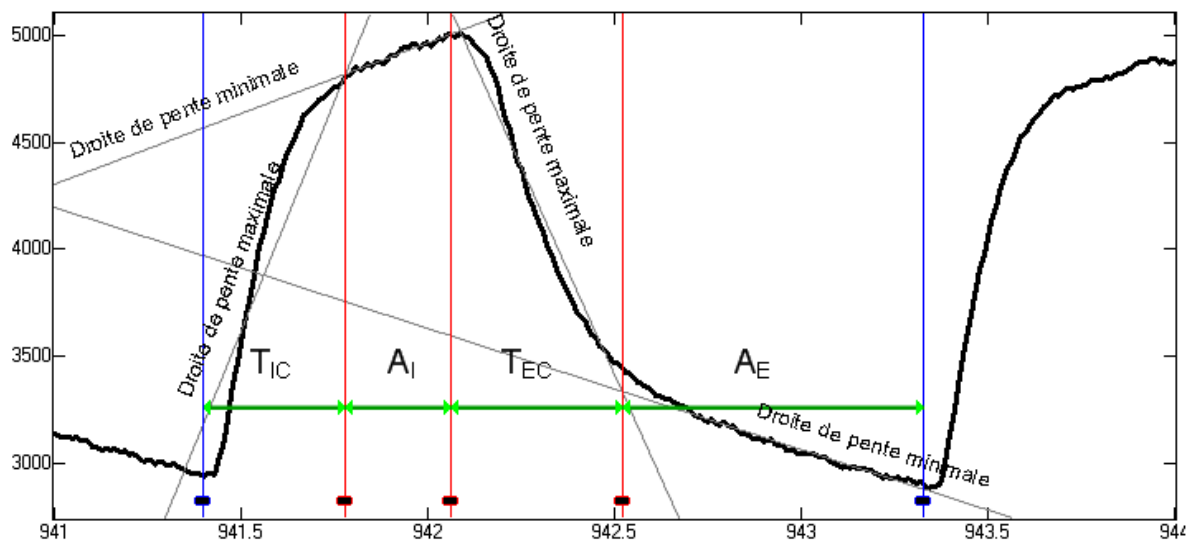


Figure 4 : Tracé pléthysmographique d'une respiration de type apneustique de rat avec les curseurs du début d'inspiration en bleu (minimum), et de gauche à droite les curseurs rouges respectivement du début d'apnée inspiratoire, du début d'expiration (maximum) et du début d'apnée inspiratoire.

Lors d'une respiration de type apneustique, cette méthode n'est plus adaptée puisque des périodes à débit respiratoire faible : apnées, surviennent après l'inspiration et l'expiration (**Figure 3**). Le début de ces apnées a été déterminé automatiquement à l'intersection de la droite de pente maximale avec la droite de la pente minimale (**Figure 4**). Les paramètres déterminés sont liés selon les formules suivantes :

- $T_I = T_{IC} + A_I$, et ;
- $T_E = T_{EC} + A_E$.

3.5 Méthodes de dosage

Les études cinétiques sont menées avec des rats préalablement cathétérisés. Le jour de l'expérimentation, l'animal est placé dans une boîte de contention. Les prélèvements de sang d'un volume d'environ 100 μL sont :

- Soit immédiatement congelés puis transportés à l'Institut pour analyse (éthanol et GHB) ;
- Soit centrifugés. Le sérum recueilli est immédiatement congelé puis transporté à l'Hôpital Saint-Louis pour analyse (acides organiques).

Les dosages sont menés sur des échantillons décongelés et ramenés à température ambiante.

3.5.1 Dosage de l'éthanol

3.5.1.1 CPG/DIF

La détermination de l'éthanolémie est adaptée de la « ME083 Dosage d'alcools et de l'acétone par CG/DIF » (Roussel et coll., 2008), inscrite au plan Qualité de l'IRCGN et faisant partie des méthodes pour lesquelles l'IRCGN est accrédité par le COFRAC. La méthode a été validée selon les règles en vigueur : son domaine d'exactitude s'étend de 0,2 à 4,0 g.L^{-1} , la limite inférieure de détection est de 0,07 g.L^{-1} et l'incertitude de mesure est inférieure à 10 %.

Pour cette étude et en raison du plus faible volume de sang chez le rat, la prise d'essai a été réduite à 10 μL (originellement dans la ME083, la prise d'essai est de 100 μL). La prise d'essai est diluée au 10ème dans la solution aqueuse de tert-butanol. 2 μL de la solution obtenue sont injectés et élués au travers de la colonne HP BLOOD-ALCOHOL. L'éthanol est détecté par ionisation de flamme. L'éthanolémie est déterminée en fonction du rapport du

signal de l'éthanol à celui du tert-butanol avec une gamme d'étalonnage externe. Lors de la série d'essais, deux solutions sanguines de contrôle sont analysées.

Pour les échantillons présentant des concentrations inférieures à la limite inférieure de quantification, dans la mesure du réalisable, des dilutions au demi ou au cinquième sont analysées à la place de celles au dixième.

Cette technique a été mise en œuvre jusqu'à la panne définitive du chromatographe 5890.

3.5.1.2 ET/CPG/DIF

La détermination de l'éthanolémie est adaptée de la « ME359 Dosage d'alcools et de l'acétone par ET/CG/DIF », inscrite au plan Qualité de l'IRCGN et faisant partie des méthodes pour lesquelles l'IRCGN est accrédité par le COFRAC. La méthode a été validée selon les règles en vigueur : son domaine d'exactitude s'étend de 0,17 à 5,0 g.L⁻¹, la limite inférieure de détection est de 0,06 g.L⁻¹ et l'incertitude de mesure est inférieure à 12 %.

Pour cette étude et en raison du plus faible volume de sang chez le rat, la prise d'essai a été réduite à 25 µL (originellement dans la ME359, la prise d'essai est de 50 µL). La prise d'essai est diluée dans 300 µL de la solution aqueuse de tert-butanol et 1,25 mL de chlorure de sodium cristallin. Les flacons sont agités et chauffés à 85°C pendant 30 minutes, 1 mL de l'espace de tête est injecté et élué au travers de la colonne HP BLOOD-ALCOHOL. L'éthanol est détecté par ionisation de flamme. L'éthanolémie est déterminée en fonction du rapport du signal de l'éthanol à celui du tert-butanol avec une gamme d'étalonnage externe. Lors de la série d'essais, deux solutions sanguines de contrôle sont analysées.

Pour les échantillons présentant des concentrations inférieures à la limite inférieure de quantification, dans la mesure du réalisable, la prise d'essai est ramenée à 50 µL.

3.5.2 Dosage du GHB par CPG/SM/SM

Le dosage du GHB sanguin a été adapté de la « ME243 Recherche et dosage de l'acide γ -hydroxybutyrique dans les urines par CPG-SM », inscrite au plan Qualité de l'IRCGN. Les différences consistent au ratio du split : 50 au lieu de 5 précédemment, et à l'acquisition en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) en lieu et place du mode SIM (Single Ion Monitoring). La nouvelle méthode a été validée selon les règles en vigueur : son domaine d'exactitude s'étend de 2 à 500 mg.L⁻¹, la limite inférieure de détection est de 0,6 mg.L⁻¹ et l'incertitude de mesure est inférieure à 15 %.

La prise d'essai de 40 μ L de sang est diluée et clarifiée par 80 μ L d'acétonitrile. Après centrifugation 50 μ L du surnageant sont dilués au demi dans la solution d'étalonnage interne (GHB-D₆). Le mélange obtenu est évaporé à sec, repris et dérivé par le BSTFA à 1% de TMCS (20 minutes à 80°C). Un microlitre de la solution est analysé après une injection en split au 50^{ème}. Le GHB-TMS et son analogue hexadeutééré sont identifiés en mode MRM avec les transitions suivantes :

Tableau 9 : Paramètres d'acquisition du mode MRM

Ion sélectionné par le 1er quadripôle	Ion sélectionné par le 3ème quadripôle	Energie de collision	Temps d'acquisition (s)
(+) 233.0	(+) 73.0	45.0 V	0.040
(+) 233.0	(+) 147.0	30.0 V	0.040
(+) 233.0	(+) 233.0	30.0 V	0.040
(+) 239.0	(+) 147.0	40.0 V	0.040
(+) 239.0	(+) 239.0	40.0 V	0.040

Le GHB sanguin est déterminé en fonction du rapport du signal du GHB-TMS à celui du GHB-D₆-TMS avec une gamme d'étalonnage externe. Lors de la série d'essais, deux solutions sanguines de contrôle sont analysées.

3.5.3 Dosage des acides organiques

Dans un tube Eppendorf, 100 μL de sérum (échantillon, points de gamme et contrôles) sont précipités par 200 μL d'acétonitrile contenant 20 mg.L^{-1} de formiate (étalon interne). Après agitation et centrifugation (14000 tours. min^{-1} pendant 5 minutes), le surnageant est décanté puis évaporé à sec dans un tube borosilicaté à température ambiante. Le résidu sec est repris par 100 μL de tampon de séparation. Les solutions obtenues sont introduites dans le capillaire en mode hydrodynamique sous un temps variable (2 à 8 s). La séparation se fait selon le principe de l'électrophorèse de zone dans un capillaire de silice (75 μm de diamètre x 50 cm de longueur effective) dynamiquement recouvert d'une couche polycationique (dynamic coating) avant l'analyse de chaque échantillon, de façon à inverser le flux électro-osmotique. La séparation est réalisée sous un voltage de 30 kV, en polarité inverse à une température de 25°C. Les acides organiques sont détectés en mode ultraviolet indirect à 254 nm. Dans ces conditions de séparation, les temps de migration et les mobilités apparentes sont respectivement pour :

- les formiates 3,60 min et $\mu_e = -0,00053592 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$;
- les acétates 4,78 min et $\mu_e = -0,00039133 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$;
- les acéto-acétates 4,88 min et $\mu_e = -0,00038227 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$;
- les lactates 4,94 min et $\mu_e = -0,00037622 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Pour tous les acides, la méthode est linéaire de 15 à 4000 mg.L^{-1} correspondant à une linéarité de :

- 0,25 à 67,8 mmol.L^{-1} pour les acétates ;
- 0,15 à 39,2 mmol.L^{-1} pour les acéto-acétates ;
- 0,17 à 44,1 mmol.L^{-1} pour les lactates.

Les limites de détection et de quantifications sont respectivement de 5 et 15 mg.L⁻¹ (sous une injection de 8 s), soit :

- 0,08 et 0,25 mmol.L⁻¹ pour les acétates ;
- 0,05 et 0,15 mmol.L⁻¹ pour les acéto-acétates ;
- 0,06 et 0,17 mmol.L⁻¹ pour les lactates.

Pour les trois acides, les coefficients de variation de l'exactitude sont inférieurs à 11 %. Il n'y a pas d'interférence avec l'héparine, ni avec différents anions inorganiques physiologiques, soit parce qu'ils sont rapidement élués (chlorures : 2,66 min), soit car ils ne sont pas détectés aux concentrations physiologiques (sulfates, phosphates, nitrates).

3.6 Méthodes statistiques

Sauf précision, les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Les valeurs mesurées sont considérées comme normalement distribuées. Le seuil de significativité a été choisi à 5 % ($p < 0,05$). Les données chronologiques débutent à T₀, dernier temps avant administration.

Les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés avec le logiciel Prism®, en fonction de la configuration :

- Soit les résultats sont comparés avec une analyse de variance à 2 facteurs (ANOVA-2). Si l'interaction temps*traitement est significative, un post-test de Bonferroni est réalisé ;
- Soit les résultats sont comparés avec une analyse de variance à 1 facteur (ANOVA-1) avec un post-test de Bonferroni ;
- Soit les résultats sont comparés par un test t avec si nécessaire une correction de Welch si l'homoscédasticité n'est pas respectée ;

- Soit la corrélation est vérifiée par un test de Pearson.

Les aires sous la courbe (AUC) sont calculées pour chaque animal en utilisant la méthode des trapèzes (Murray, 1981) et sont ensuite comparées en utilisant la méthode adaptée.

3.7 Représentations graphiques

L'essentiel des représentations graphiques consiste en un tracé de l'évolution du paramètre selon le temps. Sauf indications contraires, seules les différences significatives avec le groupe Témoin sont indiquées, elles sont représentées par des points de la même couleur que celle du groupe correspondant, selon la codification suivante ; • $p < 0,05$; •• $p < 0,01$; ••• $p < 0,001$.

3.8 Paramètres cinétiques et modélisation

Dans une première approche descriptive, les paramètres pharmacocinétiques : C_{max} , T_{max} , $AUC_{0 \rightarrow 240}$ et CL/F_{IP} , décrits ci-après, ont été estimés à partir des cinétiques établies. Ils sont exprimés comme la moyenne \pm l'écart type (SD) des valeurs observées à l'exception du T_{max} qui est la médiane [intervalle des valeurs : minimum - maximum] des valeurs observées.

- Le C_{max} est la concentration maximale observée pendant la durée des expérimentations ;
- Le T_{max} est le temps nécessaire pour atteindre le C_{max} ;
- L' $AUC_{0 \rightarrow 240}$ est l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps. A certaines doses, la substance n'étant pas éliminée du compartiment sanguin au bout de 240 min, l' $AUC_{0 \rightarrow 240}$ ne représente que partiellement l'AUC totale ;
- La CL/F_{IP} est la clairance apparente par voie IP. La biodisponibilité des substances n'ayant pas été déterminée après administration intraveineuse (IV) dans notre modèle,

seule la clairance apparente peut être proposée. CL/F_{IP} est estimée par le calcul :

$$\frac{Dose}{AUC_{240}} \text{ dans la mesure où l'AUC}_{0 \rightarrow 240} \text{ peut représenter l'AUC totale.}$$

Les cinétiques ont ensuite été modélisées selon une approche en population. Les modélisations ont été réalisées avec le logiciel MONOLIX 4.1.2 dans sa version de base par étapes et les modèles finaux ont été validés en fin de processus. Lors d'une modélisation de population, les paramètres pharmacocinétiques sont estimés sur l'ensemble des données de tous les individus. Ces paramètres décrivent alors la cinétique d'un individu moyen de cette population.

Ce type de modélisation propose un modèle unique et cohérent pour l'ensemble de la population, ce qui autorise, à l'issue, la comparaison des paramètres individuels obtenus à partir des paramètres de population. Ces paramètres individuels sont composés du paramètre de population, de la variabilité intersujets et de la variabilité interoccasion. Cette méthode permet aussi de tester l'influence des paramètres entre eux : covariances et de paramètres externes comme le poids et la dose : covariables sur les paramètres pharmacocinétiques.

1/ Plusieurs modèles mathématiques ont été testés, pour chaque modélisation, toutes les hypothèses ont été testées :

- Absorption d'ordre 0 ou d'ordre 1 ;
- Elimination linéaire ou non linéaire de type Mickaelis-Menten ;
- Distribution dans 1, 2 ou 3 compartiments.

2/ Les modèles mathématiques retenus ont été soumis au choix du modèle d'erreur résiduelle : constante ($y = f + a e$), proportionnelle ($y = f + b f e$) ou combinée ($y = f + (a + b f) e$) avec y : observation, f : concentration prédite, e : erreur résiduelle et a et b constantes.

3/ Enfin, l'influence des covariances et des covariables *a priori* : dose et poids des animaux a été testées.

A chaque étape, les critères d'acceptation ont été :

- Pour les paramètres du modèle structural : la réalité de leur valeur et une erreur-type relative inférieure (RSE : Relative Standard Error) à 50 % ;
- Pour les paramètres du modèle statistique : une RSE inférieure à 100 % voire 50 %, si ce critère n'est pas respecté, la variabilité du paramètre est ôtée ;
- Pour les scores de vraisemblance : la significativité des modifications (baisse ou hausse). Les scores de vraisemblance ont été déterminés après 20 000 itérations ;
- Pour les représentations graphiques : l'amélioration de celles-ci pour les confrontations observés/prédits, les percentiles de prédiction et la répartition des observations. Les intervalles de prédiction ont été établis après 1 000 itérations.

Le modèle final accepté, les paramètres obtenus sont exprimés comme la moyenne \pm l'erreur-relative standard (RSE) et éventuellement confrontés à d'autres paramètres observés comme la température ou le pH.

4 Protocoles expérimentaux

Les protocoles mis en œuvre sont décrits ci-dessous sous une forme standardisée.

4.1 Règles générales

Les animaux ont été distribués aléatoirement entre les groupes. Le nombre de groupes, leur descriptif et leur effectif sont précisés soit dans le descriptif des protocoles soit en introduction de chaque étude dans les chapitres respectifs. Un groupe Témoin est réalisé dans chaque étude (sauf DL₅₀), il est constitué d'animaux recevant du sérum physiologique ou pour l'étude du THC, une solution de Tween 80 à 5% dans le sérum physiologique à 3% v/v d'éthanol. Le volume administré est le même que celui des substances étudiées, soit 10 mL.kg⁻¹.

Le poids moyen des animaux par groupe a été testé par une analyse de variance à 1 facteur (ANOVA-1), si une différence significative est décelée, une remarque spécifique est reportée dans les résultats.

4.2 Détermination de la DL₅₀

Les animaux sont distribués aléatoirement entre les 3 séries (n = 6). Les séries se distinguent par la dose initiale calculée à partir d'une DL₅₀ rapportée (DL_{50r}) : 2/3 DL_{50r}, DL_{50r}, 3/2 DL_{50r}. Pour chaque série, une DL₅₀ est déterminée. La valeur rendue est la moyenne de ces 3 valeurs.

4.3 Cinétiques sanguines

4.3.1.1 Cinétiques sanguines artérielles

Les échantillons sanguins ont été prélevés chez des animaux cathétérisés au niveau de l'artère fémorale selon la planification suivante : 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210 et

240 minutes. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et puisque le modèle animal était identique, les prélèvements sanguins destinés à l'analyse des gaz du sang ont été réalisés simultanément sur les mêmes animaux. Cette rationalisation a nécessité le relevé continu de la température rectale. Le volume sanguin prélevé, environ 3 mL, n'a pas excédé le volume maximal admis (Diehl et coll., 2001), d'autant que pour composer les pertes liquidiennes et minimiser les phénomènes de coagulation, 0,5 mL de sérum physiologique hépariné a été administré à 30, 60, 120 et 180 minutes.

4.3.1.2 *Cinétiques sanguines veineuses*

Les échantillons sanguins ont été prélevés chez des animaux cathétérisés au niveau de la veine caudale selon la planification initiale suivante : 0, 20, 40, 60, 120, 180 et 240 minutes. Le volume sanguin prélevé, moins de 2 mL, n'excède pas le volume maximal admis (Diehl et coll., 2001) comme précédemment 0,2 mL de sérum physiologique hépariné a été administré à 30, 60, 120 et 180 minutes.

4.4 Paramètres respiratoires

4.4.1 Paramètres respiratoires en ventilation de repos

L'étude pléthysmographique a été menée sur des rats équipés d'une sonde de radiotélémétrie. Les paramètres respiratoires sont déterminés selon la même planification que celle des cinétiques artérielles.

L'évolution de la température des chambres de pléthysmographie a été testée par une ANOVA-2, si une différence significative est décelée, une remarque spécifique est reportée dans les résultats.

4.4.2 Gaz du sang en ventilation de repos

Comme indiqué précédemment, ce type d'étude a été menée sur des échantillons sanguins obtenus lors des études cinétiques. Les prélèvements et mesures ont été réalisés en suivant la même planification que l'étude cinétique artérielle.

4.4.3 Paramètres respiratoires lors des épreuves d'hypercapnie et d'hypoxie exogènes intermittentes

L'étude pléthysmographique a été menée sur des rats équipés d'une sonde de radiotélémétrie. En raison des nécessités techniques évoquées au 3.4.2, les paramètres respiratoires en air sont déterminés selon la planification suivante : 0, 15, 35, 55, 115, 175 et 235 min et en hypercapnie ou hypoxie à 0, 20, 40, 60, 120, 180 et 240 min.

Chapitre 2 : études des effets respiratoires de l'éthanol

1 *Etude A1 : Détermination de la DL₅₀*

La DL₅₀ a été déterminée à : $3,57 \pm 0,34 \text{ g.kg}^{-1}$ [$3,46 - 3,76 \text{ g.kg}^{-1}$].

Lors de cette étude, les animaux sont rapidement devenus comateux. Cette période de coma est suivie chez les survivants de prostration. Après 24 heures, les animaux sont asymptomatiques et reprennent une activité normale. Les rats, qui sont décédés plusieurs jours après l'administration de l'éthanol, n'avaient pas présenté de signe clinique différent des survivants.

2 *Cinétiques sanguines d'éthanol*

2.1 *Etude A2 : Ethanolémies artérielles*

Les rats ont été répartis entre les 8 groupes ($n = 8$) : le groupe Témoin et 7 groupes Ethanol recevant une dose de 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 3 ou 4,5 g.kg^{-1} d'éthanol IP. Les premiers résultats montrant que l'éthanol n'était plus décelable dans le sang au bout de 60 min pour les doses inférieures ou égales à 0,5 g.kg^{-1} , le dernier prélèvement a été fixé à 60 min pour celles-ci.

L'éthanol a été détecté dans les prélèvements sanguins du groupe 0,125 g.kg^{-1} mais n'a pas pu être dosé. Les éthanolémies artérielles obtenues pour les groupes 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 3 ou 4,5 g.kg^{-1} sont représentées en *Figure 5*.

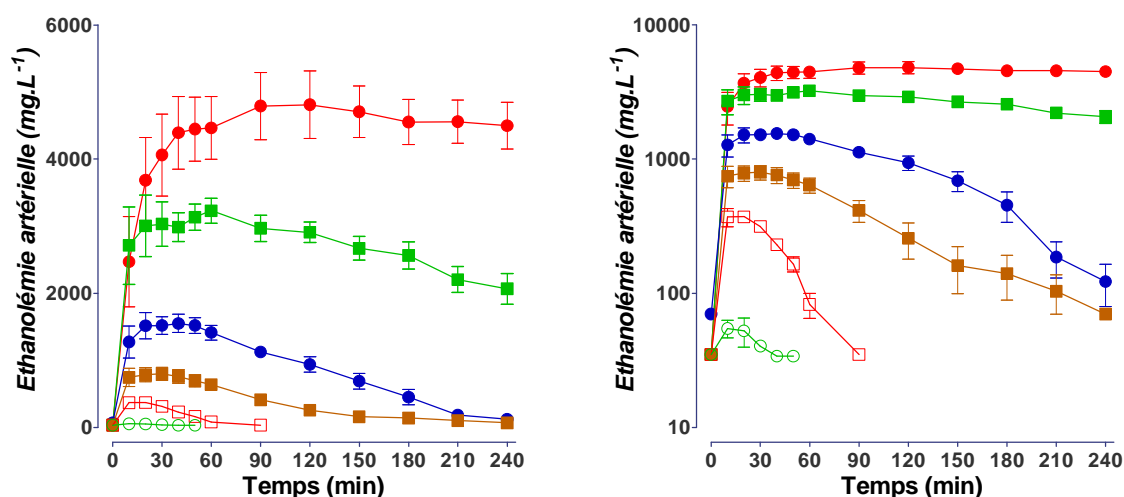


Figure 5 : Représentation linéaire (gauche) et semi-logarithmique (droite) des éthanolémies artérielles moyennes après l'administration IP d'éthanol pour les groupes 0,25 g.kg⁻¹ (vert ouvert) et 0,5 g.kg⁻¹ (rouge ouvert), 1 g.kg⁻¹ (marron), 1,5 g.kg⁻¹ (bleu), 3 g.kg⁻¹ (vert) et 4,5 g.kg⁻¹ (rouge).

Les paramètres cinétiques artériels apparents sont reportés dans la **Tableau 10**. L'AUC_{0→240}, le C_{max} et le T_{max} croissent avec la dose alors que CL/F_{IP} diminue mais les AUC_{0→240} n'étant pas complètes pour les doses à 3 et 4,5 g.kg⁻¹, la relation AUC en fonction de la dose n'a pas été représentée.

La modélisation de population a aboutit au choix d'un modèle à 1 compartiment avec absorption d'ordre 1 et élimination de type Mickaelis-Menten de formule (**Tableau 11**, **Figure 6**, **Figure 7**, **Figure 8**)

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{V_{\max}}{K_m + C} \times C + \text{entrée} \quad \text{dont} \quad \text{entrée}(t) = \frac{D}{V_d / F_{IP}} ka e^{-ka(t)}, \text{ avec :}$$

C : concentration (mg.L⁻¹) ; V_{max} : vitesse maximale d'élimination (mg.kg⁻¹.min⁻¹) ; V_d/F_{IP} : volume apparent de distribution (L.kg⁻¹) ; K_m : constante de Michaelis-Menten (mg.L⁻¹) ; D : dose (mg.kg⁻¹) ; ka : constante d'absorption (min⁻¹). Le V_{max} est corrélé à la dose.

Tableau 10 : Paramètres cinétiques artériels apparents après l'administration IP d'éthanol

Paramètre ⁽¹⁾	Dose (g.kg ⁻¹)					
	0,250	0,500	1,000	1,500	3,000	4,500
AUC _{0→240} (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)	1,12±0,68	17,3±4,1	95,5±39,3	202,0±73,0 ^a	643,8±126,0 ^c	1050,0±243,0 ^c
Cmax (mg.L ⁻¹)	62±24	446±132	1080±229 ^a	1680±544 ^c	3600±774 ^c	5130±1110 ^c
Tmax ⁽²⁾ (min)	10 [10-20]	20 [10-20]	25 [10-40]	45 [10-60]	60 [10-90]	105 [30-210]
CL/F _{IP} (L.min ⁻¹ .kg ⁻¹)	0,343±0,277	0,031±0,006 ^c	0,012±0,004 ^c	0,009±0,004 ^c	NA	NA

^a p < 0,05 par rapport aux valeurs du groupe 0,250 g.kg⁻¹

^b p < 0,01 par rapport aux valeurs du groupe 0,250 g.kg⁻¹

^c p < 0,001 par rapport aux valeurs du groupe 0,250 g.kg⁻¹

⁽¹⁾ Les paramètres sont exprimés comme la moyenne ± SD.

⁽²⁾ Le Tmax reporté est la valeur médiane des Tmax observés [Intervalle des observations]

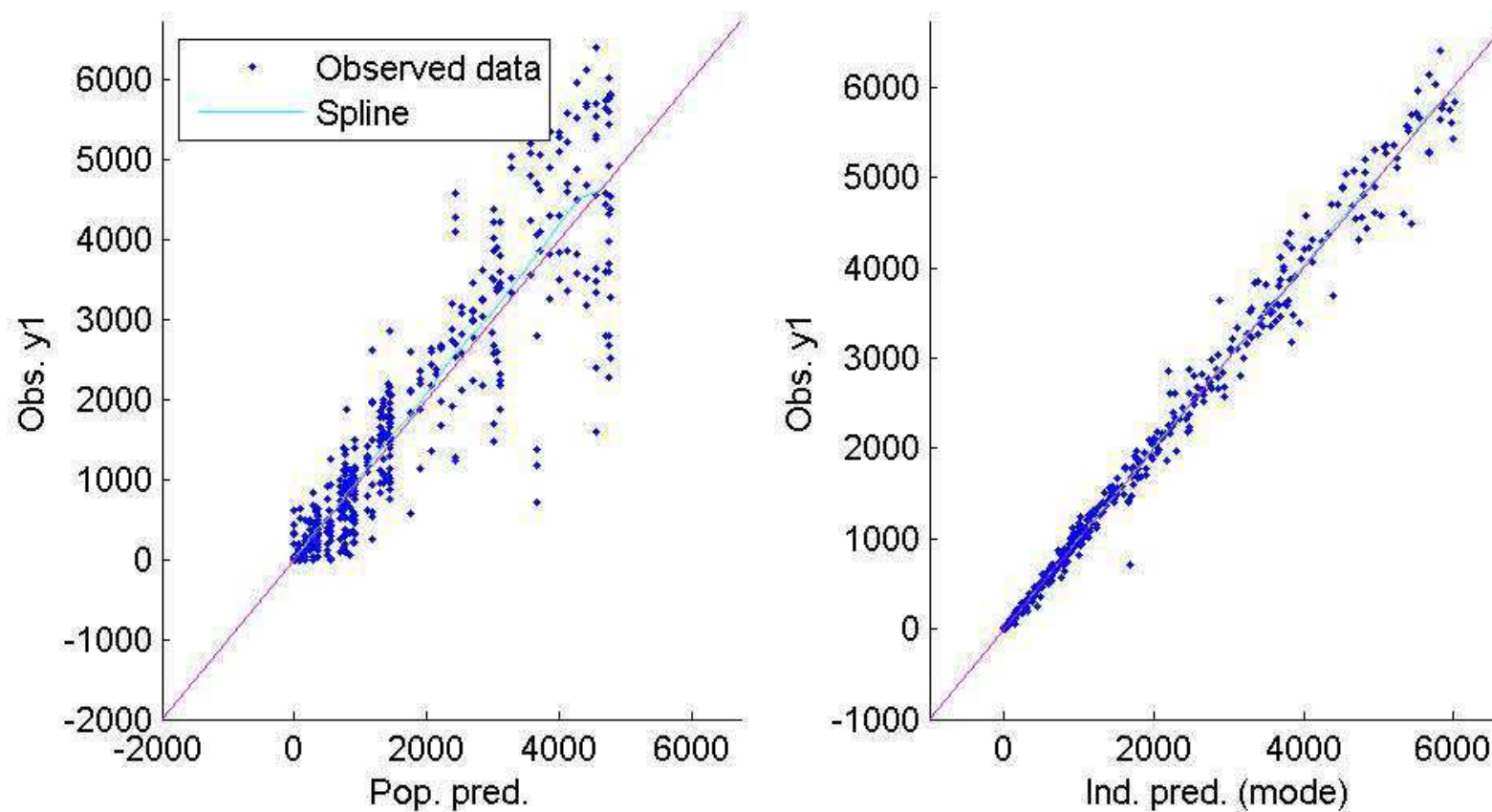


Figure 6 : Evaluation du modèle à 1 compartiment avec absorption d'ordre 1 et élimination de type Mickaelis-Menten. Corrélation des données observées aux prédictions de population (gauche) et aux prédictions individuelles (droite)

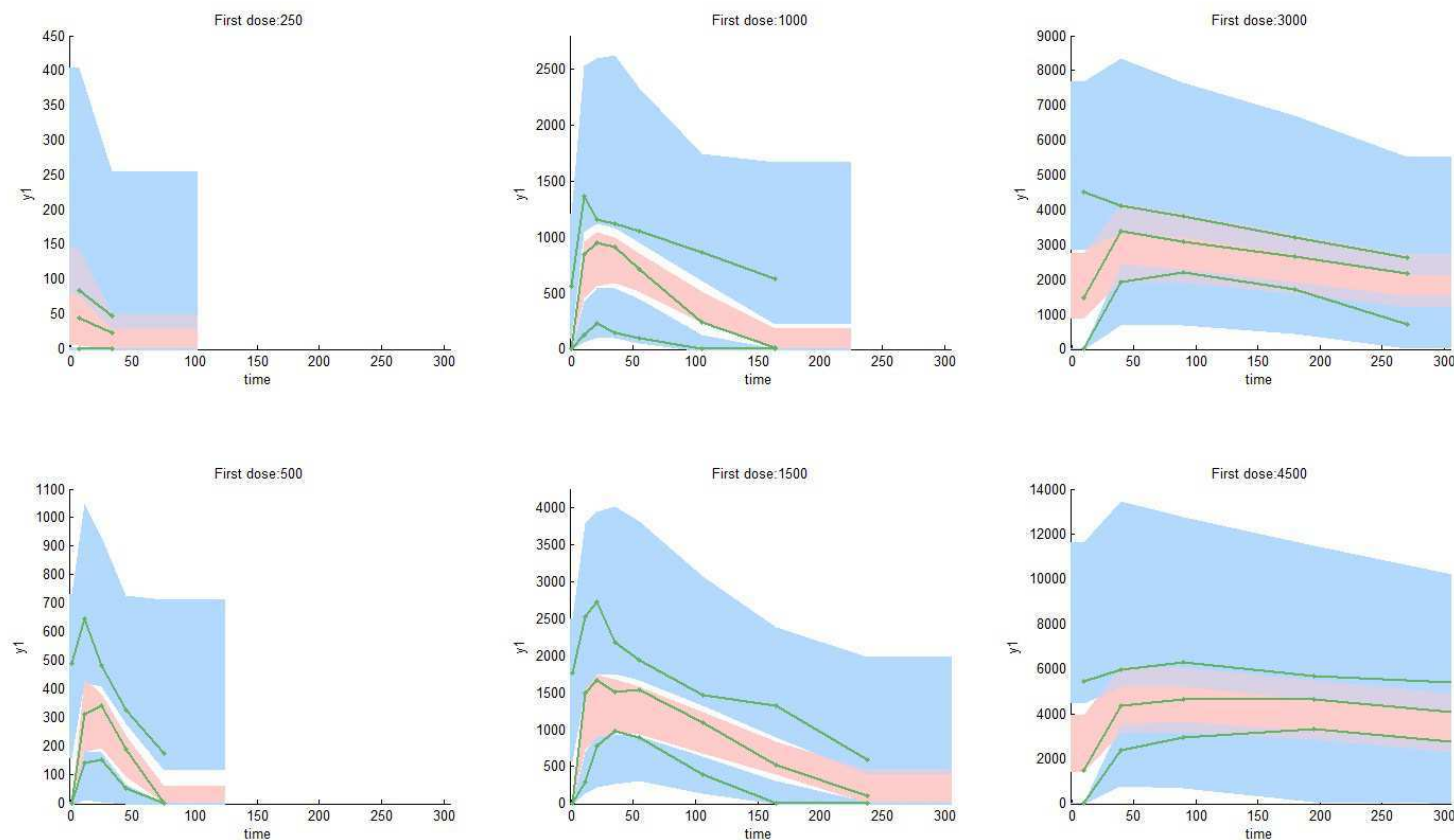


Figure 7: Evaluation du modèle à 1 compartiment avec absorption d'ordre 1 et élimination de type Mickaelis-Menten. Les lignes vertes représentent les percentiles empiriques correspondants aux données observées, les zones bleues et rose représentent les 5^{ème}, 50^{ème} et 95^{ème} percentiles des prédictions. *Attention, le logiciel MONOLIX a disposé ses résultats dans un ordre différent à la prochaine figure.*

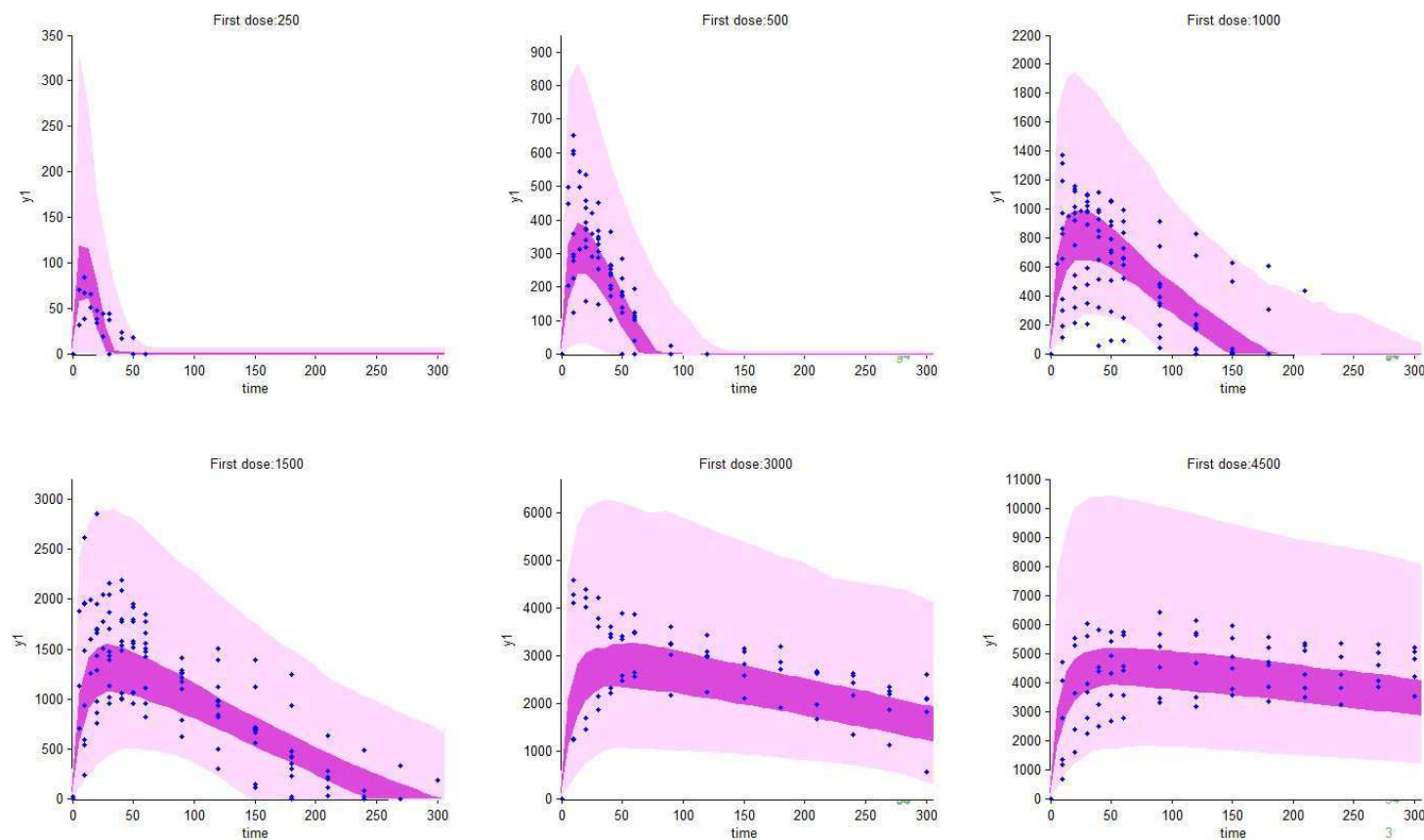


Figure 8 : Evaluation du modèle à 1 compartiment avec absorption d'ordre 1 et élimination de type Mickaelis-Menten. Les points bleus représentent les observations, les zones roses claire et foncé respectivement les 5^{ème}, 50^{ème} et 95^{ème} percentiles des prédictions. *Attention, le logiciel MONOLIX a disposé ses résultats dans un ordre différent de la précédente figure.*

Tableau 11: Paramètres pharmacocinétiques artériels de population de l'éthanol après administration IP pour des rats mâles Sprague-Dawley.

Paramètre	Estimation moyenne (RSE [%])	
	Modèle de base	Modèle final
Modèle structural		
k_a (min^{-1})	0,135 (15)	0,136 (15)
V_d/F_{IP} (L.kg^{-1})	0,895 (6)	0,904 (6)
V_{\max} ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	6,10 (5)	6,25 (5)
$V_{\max}, \theta_{\text{dose}}$		-0,25 (25)
K_m (mg.L^{-1})	1,39 (15)	3,61 (29)
Modèle statistique		
a (mg.L^{-1})	2,84 (8)	3,00 (9)
b	0,117 (4)	0,110 (4)
ω_{k_a}	0,963 (12)	0,954 (12)
ω_V	0,414 (11)	0,400 (11)
ω_{V_m}	0,338 (12)	0,275 (13)
ω_{K_m}	0,546 (22)	1,2 (18)

Avec ω estimateur de la variabilité interindividuelle, θ estimation du facteur d'influence

Le V_{\max} est corrélé à la dose (test de Pearson $p < 0,001$), à la température centrale (test de Pearson $p < 0,001$) et au pH (test de Pearson $p < 0,031$) mais la température et le pH sont eux-mêmes corrélés à la dose (test de Pearson $p < 0,001$) (*Figure 9 & Figure 10*).

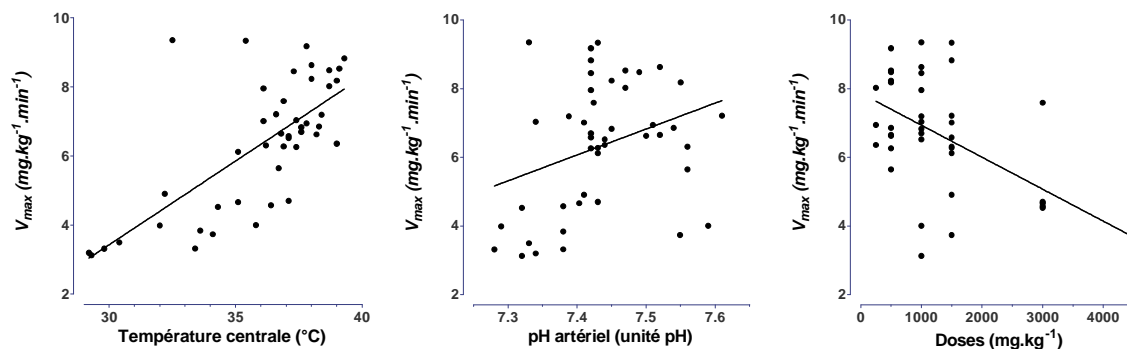


Figure 9 : Evolution du V_{\max} en fonction de la température centrale (gauche), du pH artériel (centre) et de la dose administrée (droite). Les lignes représentent les droites de régression obtenues.

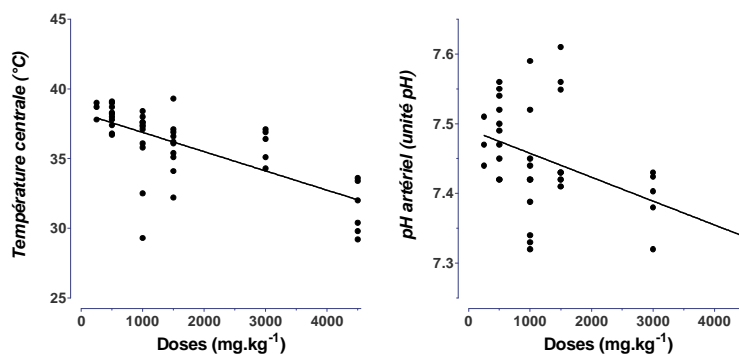


Figure 10 : Evolution de la température centrale (gauche) et du pH artériel (droite) en fonction de la dose d'éthanol administrée. Les lignes représentant les droites de régression obtenues.

2.2 Etude A3 : Ethanolémies veineuses

Les rats ont été répartis entre les 4 groupes ($n \geq 3$) : le groupe Témoin et 3 groupes Ethanol recevant une dose de 0,5 ; 1 ou 3 g.kg⁻¹ d'éthanol.

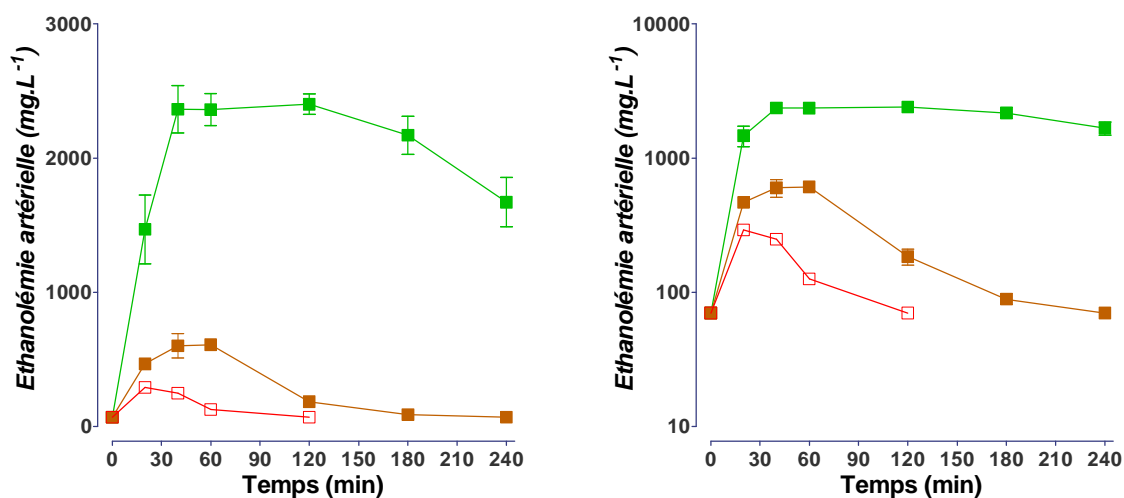


Figure 11 : Représentation linéaire (gauche) et semi-logarithmique (droite) des éthanolémies veineuses moyennes après l'administration IP d'éthanol pour les groupes 0,5 g.kg⁻¹ (rouge ouvert), 1 g.kg⁻¹ (marron) et 3 g.kg⁻¹ (vert).

Les cinétiques veineuses sont représentées en **Figure 11** et les paramètres cinétiques veineux apparents sont reportés dans la **Tableau 12**.

Tableau 12 : Paramètres cinétiques veineux apparents après l'administration IP d'éthanol

Paramètre	Dose (g.kg ⁻¹)		
	0,500	1,000	3,000
AUC _{0→240} (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)	15,9±0,1	62,2±1,8	495,6±58,6 ^a
Cmax (mg.L ⁻¹)	292±2	656±72	2614±284 ^a
Tmax (min)	20 [20-20]	40 [40-60]	60 [40-180]
CL/F _{IP} (L.min ⁻¹ .kg ⁻¹)	0,032±0,001	0,016±0,001 ^a	NA

^a $p < 0,001$ par rapport aux valeurs du groupe 0,500 g.kg⁻¹

L' $AUC_{0 \rightarrow 240}$, le C_{max} et le T_{max} croissent avec la dose alors que CL/F_{IP} diminue mais les $AUC_{0 \rightarrow 240}$ n'étant pas complètes pour la dose à 3 g.kg^{-1} , la relation AUC en fonction de la dose n'a pas été représentée. Les données de cinétiques veineuses n'ont pas permis l'obtention d'un modèle stable.

Le sang artériel est plus concentré en éthanol que le sang veineux (**Tableau 13**), particulièrement lors de la phase d'absorption, cette différence tend à se réduire voire à disparaître lors de la phase d'élimination (**Figure 12**).

Tableau 13 : Comparaison des paramètres cinétiques des éthanolémies artérielles et veineuses

Paramètre	Dose de 3 g.kg^{-1}		Dose de 1 g.kg^{-1}		Dose de $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$	
Sang	Artériel	Veineux	Artériel	Veineux	Artériel	Veineux
$AUC_{0 \rightarrow 240} (\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1})$	643 ± 47	495 ± 228^a	$95,5 \pm 39,3$	$62,2 \pm 1,8$	$17,3 \pm 4,1$	$15,9 \pm 0,1$
$C_{max} (\text{mg.L}^{-1})$	3599 ± 293	2614 ± 107^b	1080 ± 229^a	656 ± 72^a	446 ± 132	292 ± 2
$T_{max} (\text{min})$	60 [10-90]	60 [40-180]	25 [10-40]	40 [40-60]	20 [10-20]	20 [20-20]

^a $p < 0,05$ par rapport aux valeurs du groupe artériel respectif

^b $p < 0,01$ par rapport aux valeurs du groupe artériel respectif

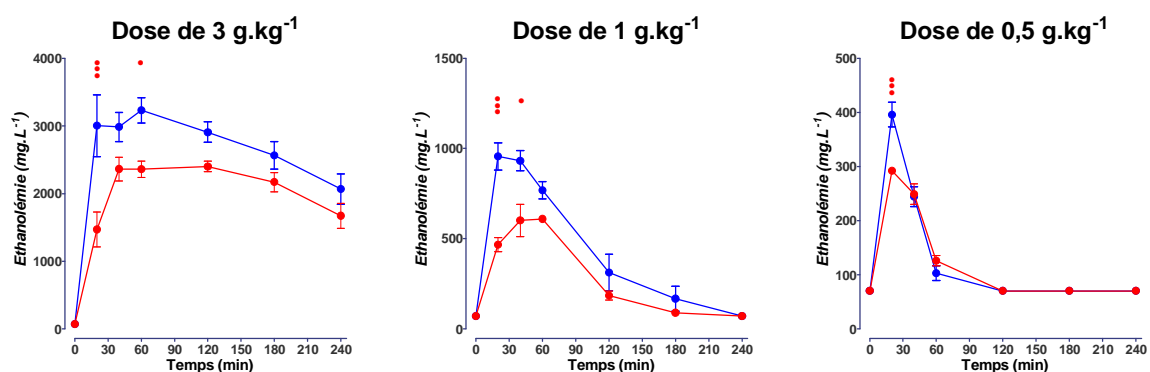


Figure 12 : Représentation linéaire des éthanolémies artérielles (bleu) et veineuses (rouge) moyennes après l'administration IP d'éthanol pour les groupes 3 g.kg^{-1} (gauche), 1 g.kg^{-1} (milieu) et $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$ (droite). Les différences significatives entre les éthanolémies artérielles et veineuses sont représentées : ● $p < 0,05$; ●●● $p < 0,001$.

3 Paramètres respiratoires

3.1 Etude A4 : Paramètres respiratoires en ventilation de repos

Les rats ont été répartis entre les 8 groupes ($n = 8$) décrits dans l'*Etude A2*. En fonction des cinétiques d'éthanol décrites précédemment, deux durées d'études ont été retenues pour la pléthysmographie : 240 min pour les doses 1 à $4,5 \text{ g.kg}^{-1}$, l'étude est nommée « fortes doses » et 60 min pour les dose de $0,125$ à $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$, l'étude est nommée « faibles doses ».

3.1.1 Signes cliniques

Les animaux des groupes Témoins et « faibles doses » étaient asymptomatiques. Quelques animaux (6/16) des groupes à 1 et $1,5 \text{ g.kg}^{-1}$ ont titubé ou sont restés prostrés après administration de l'éthanol. Enfin, la majorité des rats des groupes Témoins, « faibles doses », 1 g.kg^{-1} et $1,5 \text{ g.kg}^{-1}$ se sont endormis durant l'étude soit lors de la phase d'acclimatation, soit lors des mesures.

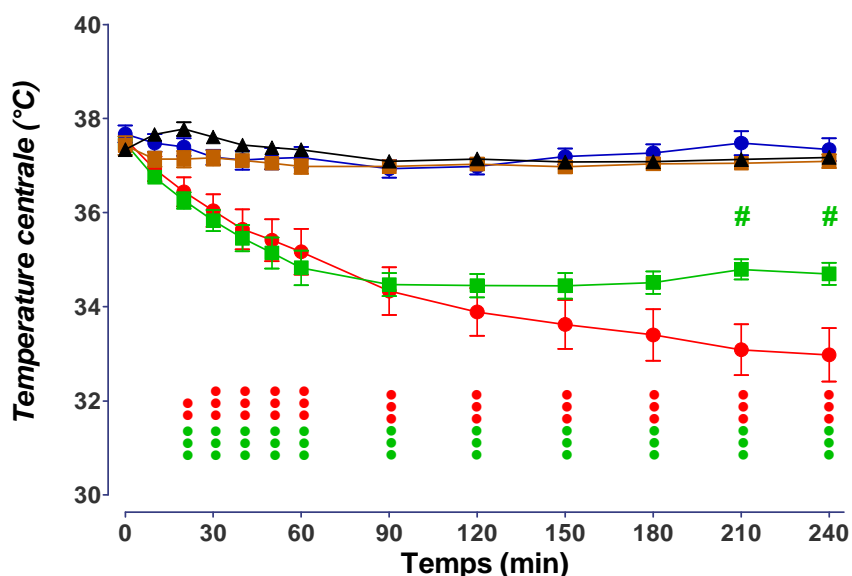


Figure 13 : Evolution de la température centrale au cours des 240 minutes après l'administration IP d'éthanol pour les groupes « fortes doses » : Témoins (noir), 1 g.kg^{-1} (marron), $1,5 \text{ g.kg}^{-1}$ (bleu), 3 g.kg^{-1} (vert) et $4,5 \text{ g.kg}^{-1}$ (rouge). Différences significatives entre le groupe 3 g.kg^{-1} (vert) et $4,5 \text{ g.kg}^{-1}$ (rouge) représentées par un #, $p < 0,05$

Les animaux des groupes 3 et 4,5 g.kg⁻¹ sont tombés en moins de 10 min dans le coma. Tous les rats du groupe 3 g.kg⁻¹ et la moitié de ceux du groupe 4,5 g.kg⁻¹ ont montré à différents temps, soit des mouvements de mastication, soit des tentatives de redressement de la tête, soit des mouvements de « nage ». La moitié des animaux du groupe 3 g.kg⁻¹ (4/8) ont montré des signes de réveil entre 150 et 240 min. A l'exception d'un seul (1/8), les animaux du groupe 4,5 g.kg⁻¹ sont restés sédatisés pendant toute la durée de l'expérimentation. Tous (groupes 3 et 4,5 g.kg⁻¹) présentaient une hypothermie franche de 20 min après l'administration jusqu'à la fin de l'étude (**Figure 13**). Ces hypothermies suivent une même évolution durant les 90 premières minutes puis elles se distinguent pour devenir significativement différentes à partir de 210 min ($p < 0,05$).

3.1.2 Paramètres respiratoires

Les paramètres respiratoires des groupes « faibles doses », 1 g.kg⁻¹ et 1,5 g.kg⁻¹ ne sont pas significativement différents de ceux des animaux témoins. Pour le groupe 3 g.kg⁻¹, la fréquence respiratoire est augmentée de façon non significative de 10 à 60 min, alors que pour le groupe 4,5 g.kg⁻¹ cette augmentation n'apparaît qu'une heure après l'injection d'éthanol (**Figure 14a & Figure 14b**). Ces augmentations de fréquence respiratoire ne sont accompagnées d'une diminution significative ($p < 0,05$) des temps expiratoires que pour le groupe 4,5 g.kg⁻¹. Les rapports T_I/T_{TOT} , sans être significatifs, montrent une tendance pour les animaux des groupes 3 et 4,5 g.kg⁻¹ à l'augmentation de la part inspiratoire dans la durée totale de la respiration.

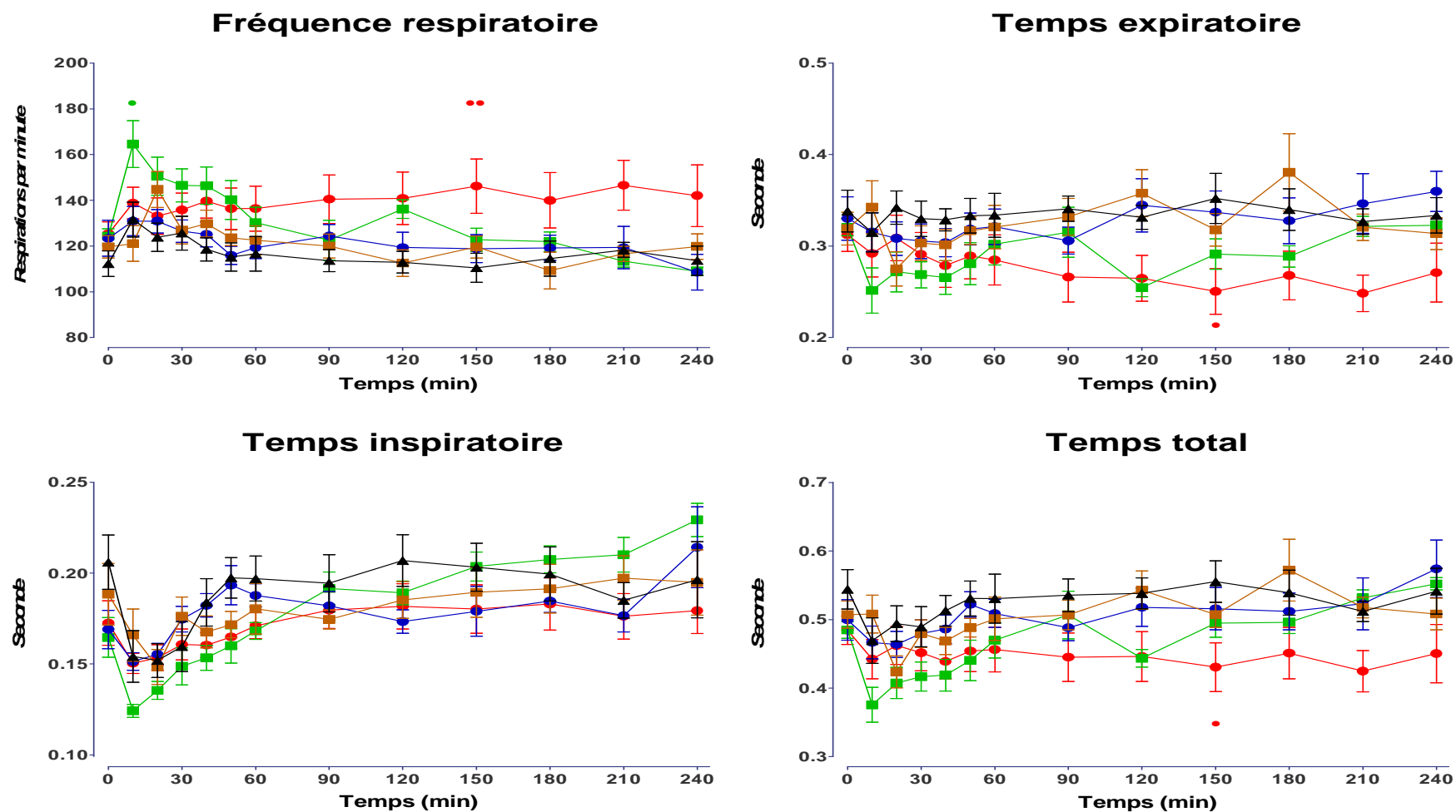


Figure 14a : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP d'éthanol pour les groupes Témoin (noir), 1 g.kg⁻¹ (marron), 1,5 g.kg⁻¹ (bleu), 3 g.kg⁻¹ (vert) et 4,5 g.kg⁻¹ (rouge).

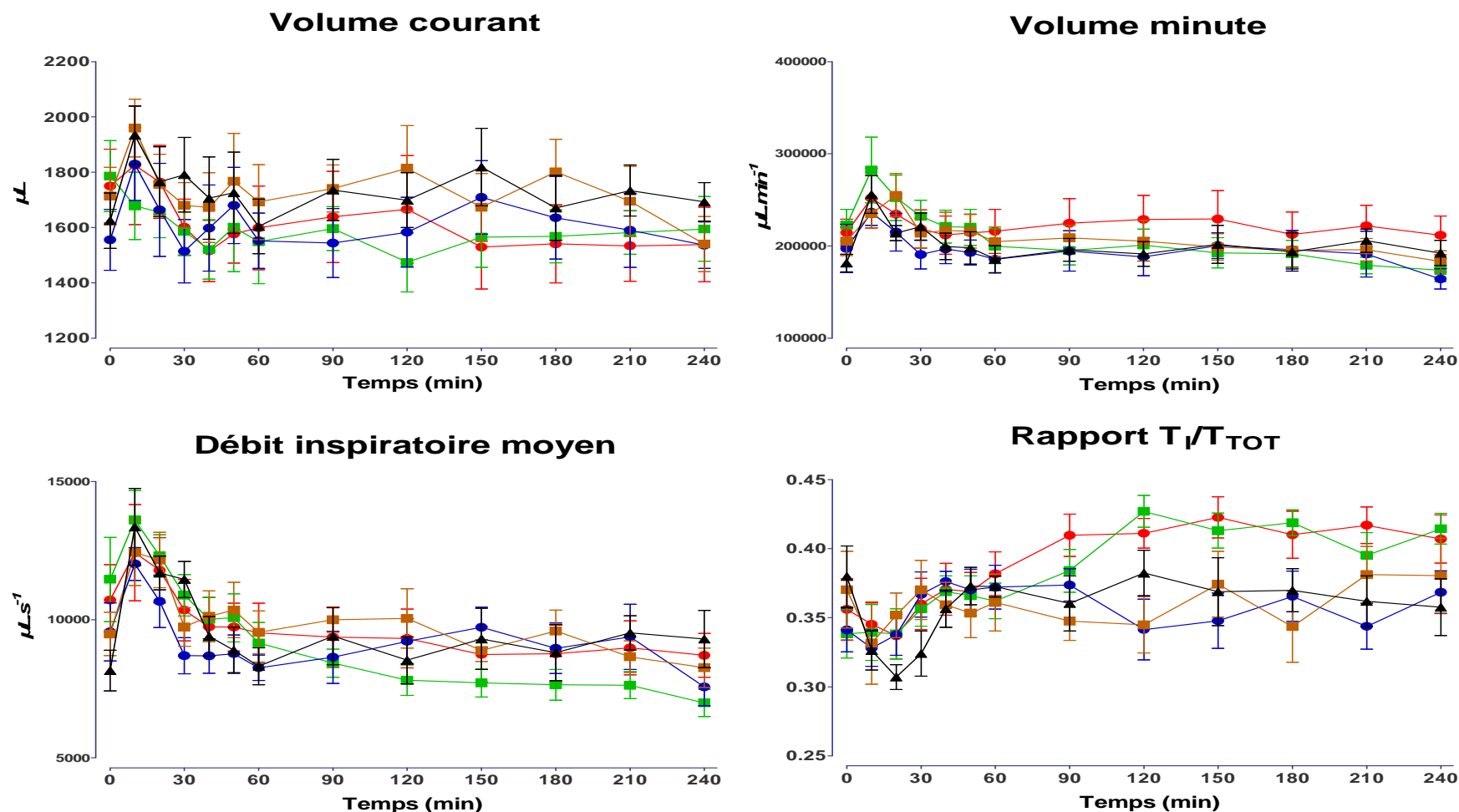


Figure 14b : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP d'éthanol pour les groupes Témoin (noir), 1 g.kg⁻¹ (marron), 1,5 g.kg⁻¹ (bleu), 3 g.kg⁻¹ (vert) et 4,5 g.kg⁻¹ (rouge).

3.2 Etude A5 : Gaz du sang en ventilation de repos

Les groupes ($n \geq 5$) et les durées d'étude sont similaires à ceux de l'*Etude A4*.

3.2.1 Signes cliniques

Les scores de conscience établis selon l'échelle proposée par Pirnay et coll. (Pirnay et coll., 2008) sont reportés en *Figure 15*. Les groupes ont présenté des stades de conscience d'intensité assez similaire pour des doses allant de 0,125 à 1,5 g.kg⁻¹.

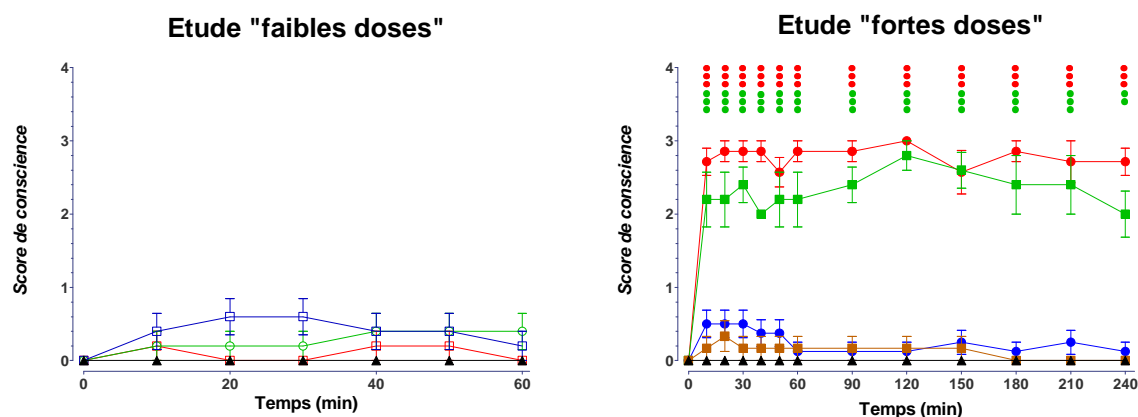


Figure 15 : Evolution du score de conscience au cours des 60 minutes après l'administration IP d'éthanol pour les groupes Témoins (noir), 0,125 g.kg⁻¹ (bleu ouvert), 0,25 g.kg⁻¹ (vert ouvert) et 0,5 g.kg⁻¹ (rouge ouvert) [Gauche] – Evolution du score de conscience au cours des 240 minutes après l'administration IP d'éthanol pour les groupes Témoins (noir), 1 g.kg⁻¹ (marron), 1,5 g.kg⁻¹ (bleu), 3 g.kg⁻¹ (vert) et 4,5 g.kg⁻¹ (rouge) [Droite].

Comme durant l'étude pléthysmographique, les animaux des groupes 3 et 4,5 g.kg⁻¹ ont présenté une altération sévère de la conscience, dès 10 min et jusqu'à la fin de l'expérimentation. Cette altération de la conscience était contemporaine d'une baisse de la température rectale (*Figure 16*), ces hypothermies étant de même intensité que celles observées lors de l'étude pléthysmographique.

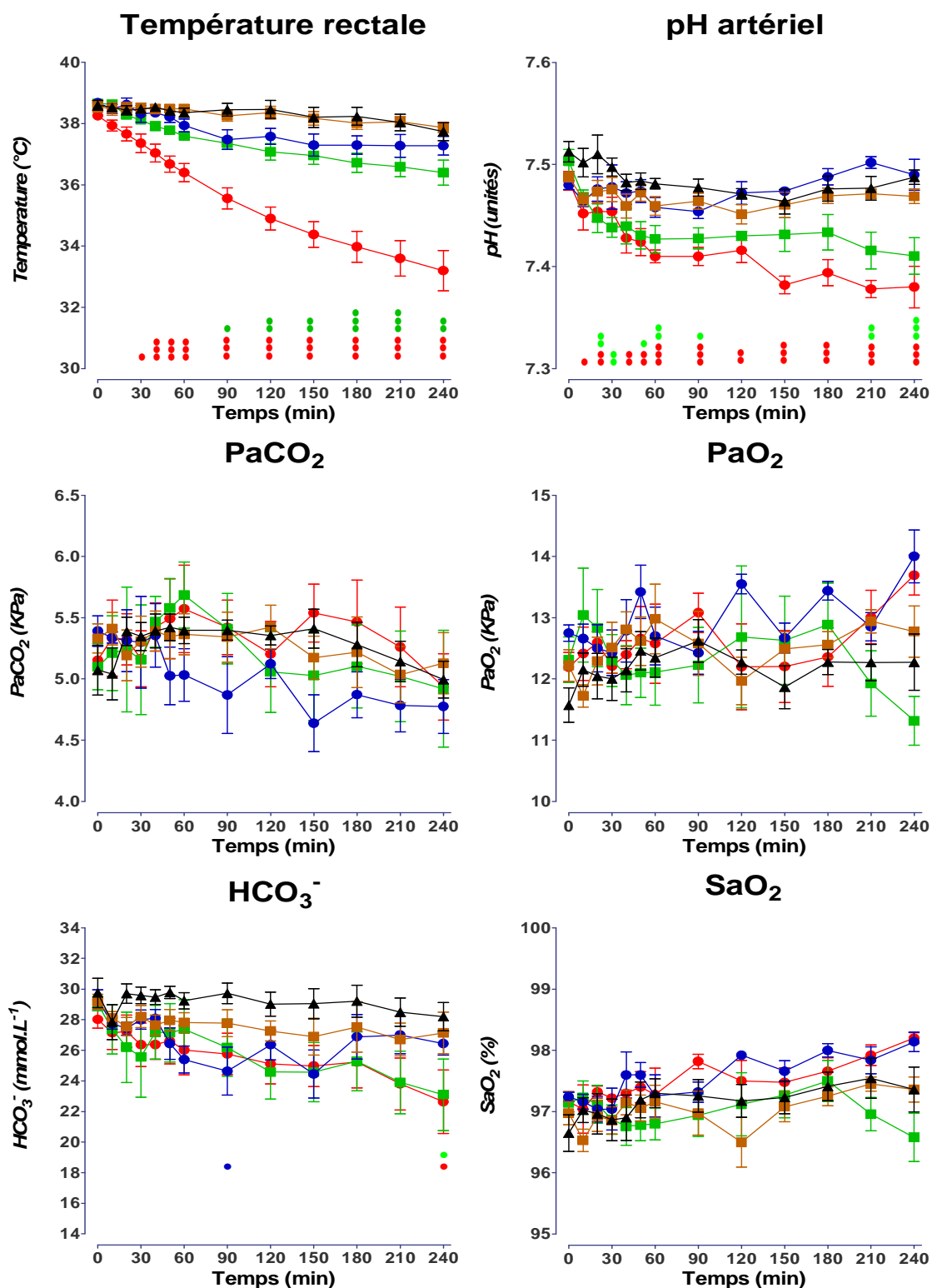


Figure 16 : Evolution de la température rectale et des paramètres des gaz du sang au cours des 240 minutes après l'administration IP d'éthanol pour les groupes Témoins (noir), 1 g.kg⁻¹ (marron), 1,5 g.kg⁻¹ (bleu), 3 g.kg⁻¹ (vert) et 4,5 g.kg⁻¹ (rouge). Les paramètres des gaz du sang sont corrigés selon la température rectale.

3.2.2 Gaz du sang

Il n'y a pas de variation significative des gaz du sang pour les groupes « faibles doses » et 1 g.kg⁻¹. Le groupe 1,5 g.kg⁻¹ a présenté une baisse des bicarbonates non significative de 60 à 150 min. Une acidémie a été mise en évidence pour les groupes à 3 et 4,5 g.kg⁻¹, ces acidémies sont accompagnées d'une tendance à la baisse non significative des concentrations en bicarbonates sanguins de 90 à 240 min (*Figure 16*).

3.3 Etude A6 : Paramètres respiratoires lors des épreuves d'hypercapnie et d'hypoxie exogènes

Les rats ont été répartis entre 2 groupes (n = 5) : le groupe Témoin et un groupe Ethanol à 3 g.kg⁻¹.

3.3.1 Hypercapnie exogène

3.3.1.1 Signes cliniques

Les rats témoins étaient asymptotiques et ne présentaient pas d'hypothermie. Au cours de l'étude en hypercapnie exogène (CO₂ à 5%), les animaux du groupe éthanol 3 g.kg⁻¹ ont présenté les mêmes signes cliniques et le même type d'hypothermie que lors de l'étude en ventilation de repos.

3.3.1.2 Paramètres respiratoires

Le groupe 3 g.kg⁻¹ n'a montré aucune différence significative tant lors des étapes en air que lors des étapes en hypercapnie exogène. Les animaux alcoolisés ont adapté leur respiration à l'hypercapnie comme les animaux témoins.

Tableau 14 : Comparaison des valeurs basales des paramètres respiratoires en air et en hypercapnie exogène (5% CO₂) lors de l'étude des effets respiratoires de l'éthanol

	Valeur basale en air (n=10)	Valeur en hypercapnie exogène (n=10)	Valeur de p du test t de Student par séries appariées	Pourcentage de variation
Fréquence respiratoire (f) en respiration par min	116 ± 5	162 ± 3	<0,0001	+ 39 %
Temps expiratoire (T _E) en s	0,332 ± 0,018	0,198 ± 0,004	<0,0001	- 40 %
Temps inspiratoire (T _I) en s	0,193 ± 0,011	0,173 ± 0,005	0,0750	NS
Temps total (T _{TOT}) en s	0,524 ± 0,023	0,371 ± 0,006	0,0002	- 29 %
Volume courant (V _T) en µL	1680 ± 109	2530 ± 126	0,0011	+ 51 %
Volume minute (V _E) en µL.min ⁻¹	192700 ± 10340	412200 ± 25160	<0,0001	+ 114 %
Débit inspiratoire moyen en µL.s ⁻¹	8920 ± 656	14760 ± 913	<0,0001	+ 65 %
Rapport T _I /T _{TOT} (sans unité)	0,368 ± 0,016	0,467 ± 0,009	<0,0001	+ 27 %

L'hypercapnie exogène a provoqué à t₀ (**Tableau 14**) une accélération de la respiration aux dépens d'une baisse de 40% du T_E avec augmentation des volumes mobilisés : baisse de 29% de T_{TOT} ; augmentation de 39% de f, de 51% de V_T, de 114% du V_E, de 65% du débit inspiratoire moyen et de 27% du régime inspiratoire.

3.3.2 Hypoxie exogène

En raison de difficultés répétées d'approvisionnement en mélange gazeux, cette étude n'a pas pu être achevée. Le quorum n'a pas été atteint, le groupe Témoin ne réunissant que 2 individus et le groupe éthanol 3 g.kg⁻¹ 4 individus.

3.3.2.1 Signes cliniques

Pendant l'étude en hypoxie exogène (12% O₂), les animaux du groupe éthanol 3 g.kg⁻¹ ont présenté les mêmes signes cliniques et le même type d'hypothermie que les précédents animaux testés à cette dose. Lors du basculement de l'air vers l'atmosphère hypoxique, les rats non alcoolisés s'activaient spontanément, explorant et reniflant la chambre de

pléthysmographie. Les mesures ont été d'ailleurs plus délicates en raison de l'activité motrice des animaux.

3.3.2.2 Paramètres respiratoires

Tableau 15 : Comparaison des valeurs basales des paramètres respiratoires en air et en hypoxie exogène (12% O₂) lors de l'étude des effets respiratoires de l'éthanol

	Valeur basale en air (n=6)	Valeur en hypoxie exogène (n=6)	Valeur de p du test t de Student par séries appariées	Pourcentage de variation
Fréquence respiratoire (f) en respiration par min	126 ± 3	153 ± 8	0,0197	+ 21 %
Temps expiratoire (T _E) en s	0,294 ± 0,013	0,248 ± 0,017	0,0332	- 15 %
Temps inspiratoire (T _I) en s	0,193 ± 0,016	0,151 ± 0,010	0,0624	NS
Temps total (T _{TOT}) en s	0,477 ± 0,013	0,399 ± 0,020	0,0147	- 16 %
Volume courant (V _T) en µL	1619 ± 33	2027 ± 55	0,0041	+ 25 %
Volume minute (V _E) en µL.min ⁻¹	204500 ± 5883	308600 ± 15640	0,0009	+ 51 %
Débit inspiratoire moyen en µL.s ⁻¹	8711 ± 760	13640 ± 550	0,0021	+ 57 %
Rapport T _I /T _{TOT} (sans unité)	0,405 ± 0,034	0,379 ± 0,019	0,4141	NS

L'hypoxie exogène a provoqué à t₀ (**Tableau 15**) une accélération de la respiration par diminution du T_E de 15 % avec augmentation des volumes mobilisés : baisse de 16% de T_{TOT} ; augmentation de 21% de f, de 25% du V_T, de 51% du V_E et de 57% du débit inspiratoire moyen.

4 Etude A7 : Acides organiques sériques artériels et veineux

Les rats ont été répartis entre 2 x 4 groupes (n ≥ 3) : deux protocoles artériel et veineux avec chacun un groupe Témoin et trois groupes Ethanol à 0,5 ; 1 et 3 g.kg⁻¹.

Les acéto-acétates sériques n'ont été décelés dans aucun échantillon, leur concentration est restée inférieure à la limite de détection : $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$. Les acétates ont présenté des cinétiques différentes pour chaque groupe quelque soit l'origine du sérum, ainsi le groupe $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$ présentait une augmentation significative entre 20 et 60 min ($p < 0,001$), celui à 1 g.kg^{-1} entre 20 et 120 ou 180 min ($p < 0,05$ à $p < 0,001$) et celui à 3 g.kg^{-1} de 20 à la fin du test, soit 240 min ($p < 0,001$) (**Figure 17**). Le sérum artériel contenait plus d'acétates que le veineux, la différence moyenne sur l'ensemble des résultats est de $0,59 \pm 0,14 \text{ mmol.L}^{-1}$.

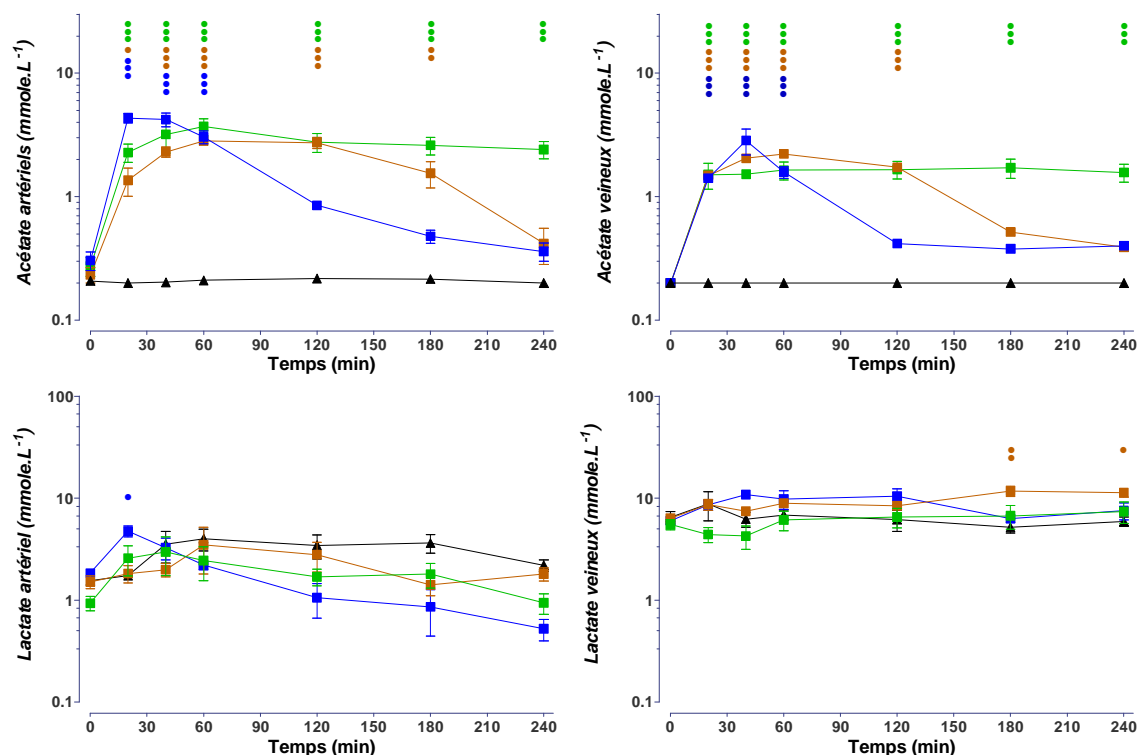


Figure 17 : Evolution des acétates et lactates sériques artériels et veineux au cours des 240 minutes après l'administration IP d'éthanol pour les groupes Témoins (noire), $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$ (bleu), 1 g.kg^{-1} (marron) et 3 g.kg^{-1} (vert).

Tableau 16 : Paramètres cinétiques apparents des acétates après l'administration IP d'éthanol

Paramètre	Dose d'éthanol (g.kg ⁻¹)					
	0,5 (n=3)	1,0 (n=4)	3,0 (n=4)	0,5 (n=3)	1,0 (n=3)	3,0 (n=3)
	Acétates artériels			Acétates veineux		
AUC _{0→240} (mmol.L ⁻¹ .min)	385±48	458±46	654±199	210±33	308±16	377±121
C _{max} (mmol.L ⁻¹)	4,42±0,78	3,08±0,33	3,82±1,18	2,84±1,16	2,22±0,10	1,84±0,52
T _{max} (min)	20 [20-40]	60 [60-120]	60 [40-60]	40 [40-40]	60 [60-60]	80 [20-180]

Les lactates sériques artérielles différaient peu entre eux quelque soit la dose (**Figure 17**), seul le groupe $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$ a présenté une concentration sérique en lactates significativement supérieure aux autres à 20 min. De même pour les lactates sériques veineux, seul le groupe 1 g.kg^{-1} a présenté une concentration supérieure aux autres à 180 et 240 min. Le sang veineux contenait plus de lactates que l'artériel, la différence moyenne est de $5,2 \pm 0.8 \text{ mmol.L}^{-1}$ (moyenne sur l'ensemble des résultats).

Chapitre 3 : études des effets respiratoires de l'association du Δ -9-tétrahydrocannabinol et de l'éthanol

L'étude des effets respiratoires de l'association du THC et de l'éthanol est composée de deux sous-études : la première à la dose la plus importante de THC n'ayant pas provoqué, lors de l'étude précédente, de modification de la respiration, soit 3 mg.kg^{-1} , la seconde à une dose provoquant des modifications de la respiration, soit $8,4 \text{ mg.kg}^{-1}$.

1 Etude B1 : Paramètres respiratoires lors de la co-administration d'éthanol et d'une dose sans effet respiratoire de THC

Les animaux sont distribués entre 4 groupes ($n = 8$) : un groupe Témoin, un groupe THC à 3 mg.kg^{-1} (T3), un groupe Ethanol à 1 g.kg^{-1} (E1) et un groupe à 3 mg.kg^{-1} de THC en association avec 1 g.kg^{-1} d'éthanol (T3E1).

Les études statistiques ont été menées avec l'ensemble des groupes. Par souci de clarté, les représentations graphiques ont été simplifiées en ne faisant apparaître que les groupes T3 ou T3E1.

1.1 Signes cliniques

Les animaux du groupe Témoin sont asymptomatiques. Les rats du groupe E1 ont présenté les mêmes signes cliniques que lors de l'étude des effets de l'éthanol, deux (2/8) ont titubé et un (1/8) est resté prostré pendant les 90 premières minutes. Après administration de THC à 3 mg.kg^{-1} , quatre (4/8) rats se sont redressés, trois (3/8) en se maintenant dès 30 ou 40 min contre la protection de la sonde de température, le dernier (1/8) tentant vainement de se redresser contre la paroi vers 150 min. L'association du THC et de l'éthanol a provoqué plus de manifestations d'incoordination, six animaux (7/8) ayant présenté soit une titubation, soit

des mouvements de « nage », à différent temps, sept (7/8) ont présenté une réduction de la mobilité avec des signes de prostration ou de coma, l'un d'entre eux (1/8) est resté comateux de 10 min jusqu'à la fin de l'expérimentation. A l'exception de ce dernier, tous les animaux ont présenté lors de l'expérimentation des périodes d'éveil et d'endormissement.

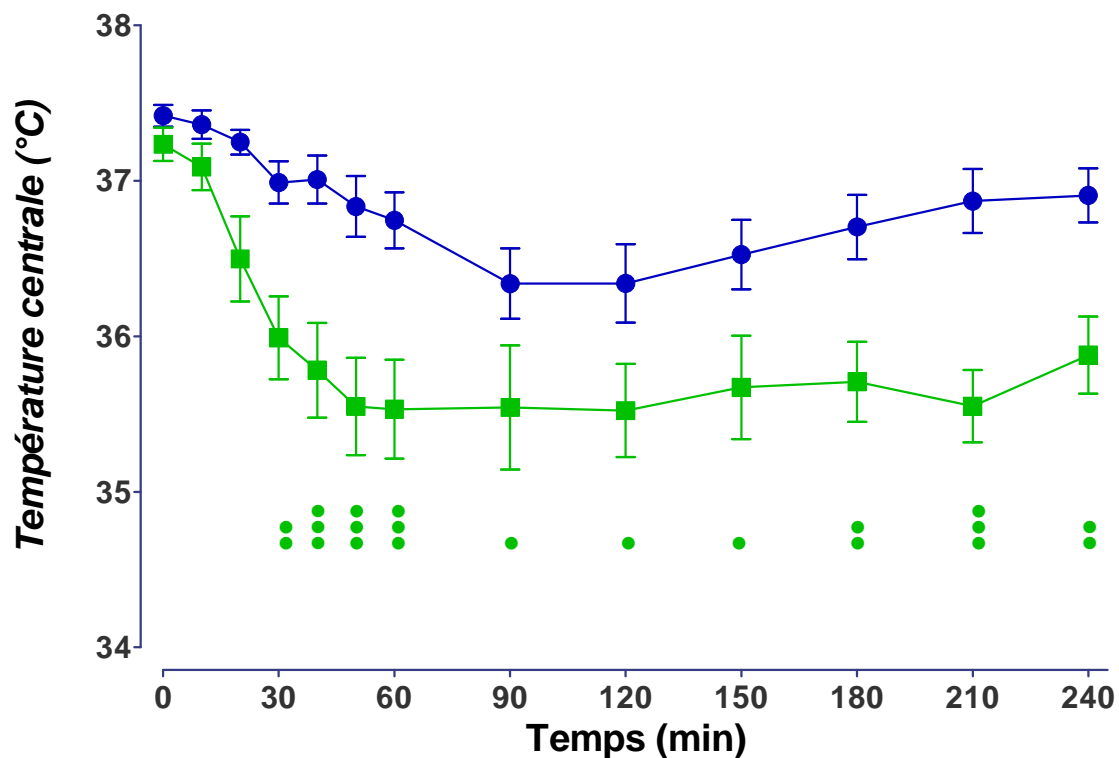


Figure 18 : Evolution de la température centrale au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : T3 (bleu) et T3E1 (vert). Seules les significativités entre T3 et T3E1 (●) ont été représentées.

Les groupes Témoin, T3 et E1 n'ont pas présenté de variation significative de leur température corporelle entre eux. Seule l'association THC – éthanol a provoqué une hypothermie significative dès 30 min ($p < 0,05$ à $p < 0,001$) (**Figure 18**).

1.2 Paramètres respiratoires

Les groupes Témoin, T3 et E1 n'ont pas présenté de différence significative dans leur respiration. Seuls les animaux du groupe T3E1 se sont différenciés significativement avec une inspiration plus lente à partir de 30 min, cette différence n'est significative avec T3 qu'entre 40 et 60 min ($p < 0,01$ à $p < 0,001$) (**Figure 19a**), avec Témoin et E1, elle dure jusqu'à 180 min ($p < 0,05$ à $p < 0,001$).

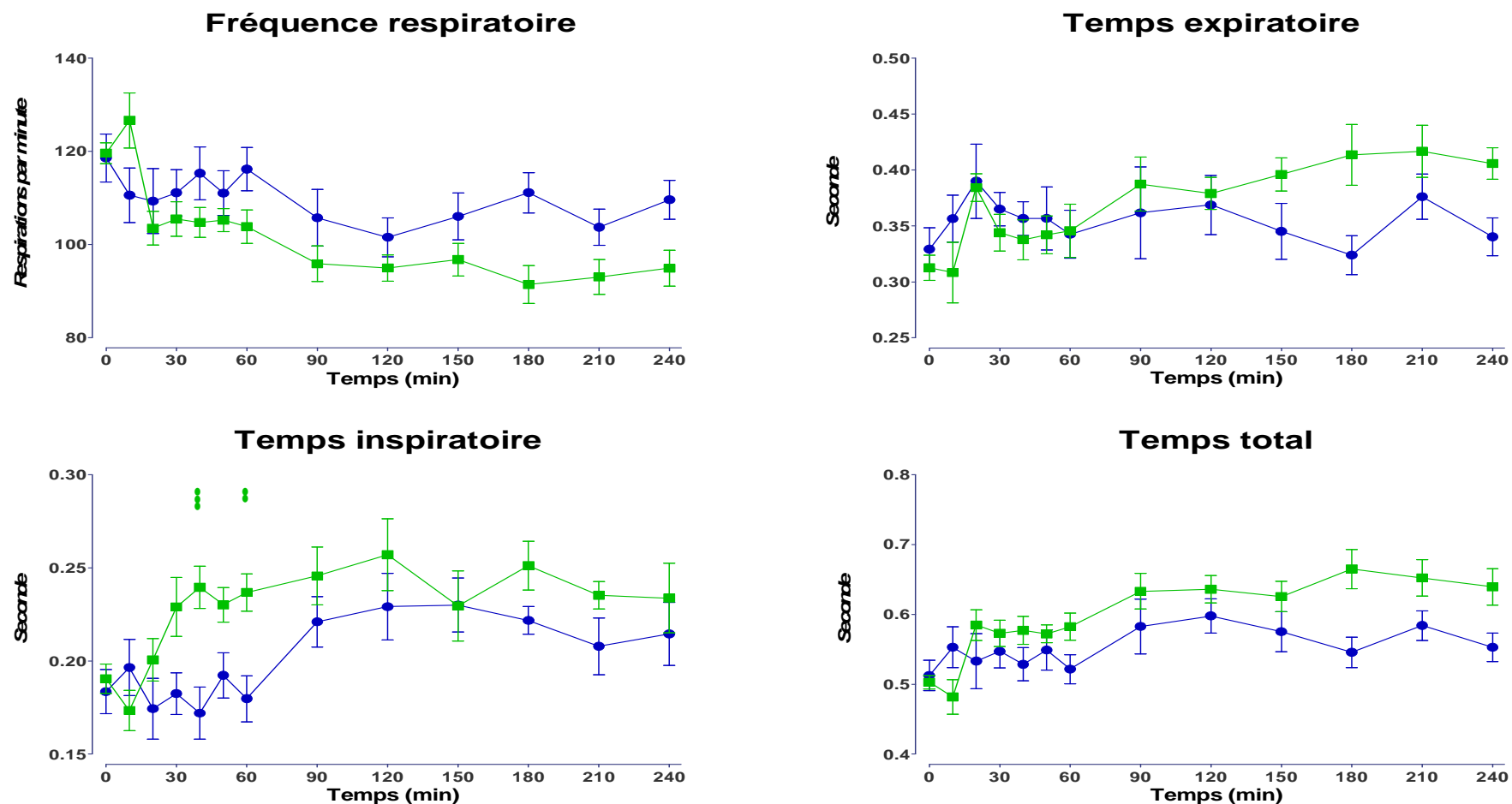


Figure 19a : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : T3 (bleu) et T3E1 (vert). Seules les significativités entre T3 et T3E1 (●) ont été représentées.

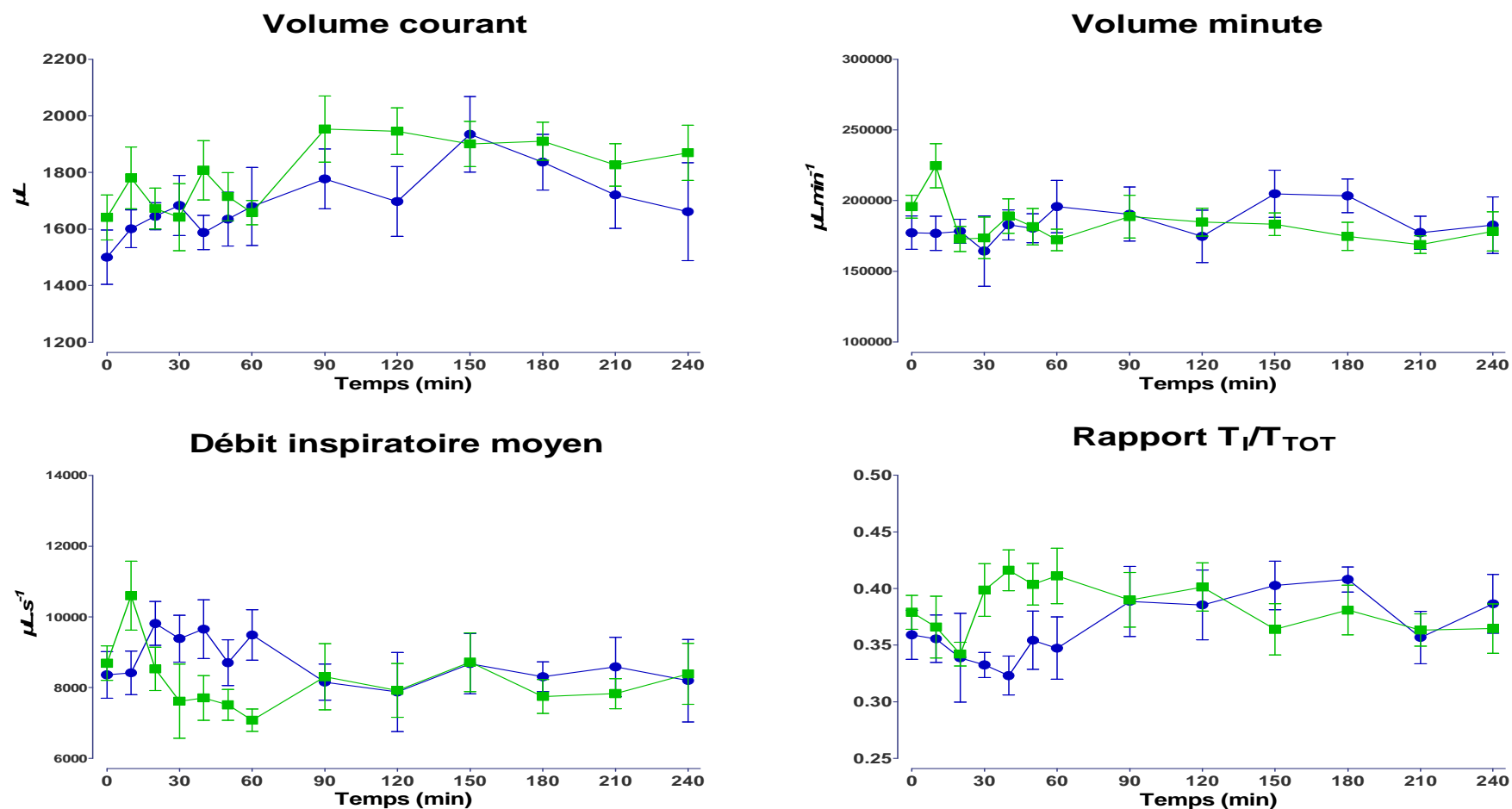


Figure 19b : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : T3 (bleu) et T3E1 (vert). Seules les significativités entre T3 et T3E1 (●) ont été représentées.

2 Etude B2 : Paramètres respiratoires lors de la co-administration d'éthanol et d'une dose de THC provoquant par elle-même une variation des paramètres respiratoires

Les animaux sont distribués entre 6 groupes ($n = 8$) : un groupe Témoin, un groupe THC à $8,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ (T8), deux groupes Ethanol à 1 g.kg^{-1} (E1) et 3 g.kg^{-1} (E3) et deux groupes à $8,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ de THC en association avec 1 g.kg^{-1} (T8E1) ou 3 g.kg^{-1} d'éthanol (T8E3). Comme pour l'étude précédente, les études statistiques ont été menées avec l'ensemble des groupes mais par souci de clarté, seuls les groupes T8, T8E1 et T8E3 sont représentés.

2.1 Signes cliniques

Les animaux témoins sont restés asymptomatiques. Les animaux du groupe E1 ont présenté les mêmes signes cliniques que précédemment (*Cf. 1.1*). Tous les rats du groupe E3 sont tombés en moins de 10 minutes dans le coma et ont soit mastiqué, soit tenté vainement de redresser la tête, soit montré des mouvements de « nage ». Dans le groupe T8, tous les individus étaient hypomobiles, prostrés dès 10 min mais sont restés réactifs, en particulier à la fermeture de l'arrivée d'air. Leur prostration a été ponctuée de mouvements de tête et d'agitation, deux (2/8) se sont mis à tourner en rond pendant quelques minutes, un (1/8) a bondi dans la boîte pendant quelques instants. Après l'administration de l'association THC 8 mg.kg^{-1} et de l'éthanol 1 g.kg^{-1} , les animaux étaient eux aussi prostrés en moins de 10 min, ils sont aussi resté réactifs, quatre (4/8) ont eu des épisodes d'agitation mais trois (3/8) ont présenté des signes de coma. L'association à la dose de 3 g.kg^{-1} d'éthanol a provoqué rapidement, en moins de 10 min, un coma chez tous les rats, un rat (1/8) a présenté des mouvements laissant penser qu'il respirait par la bouche, un autre (1/8) a montré des mouvements de « nage ».

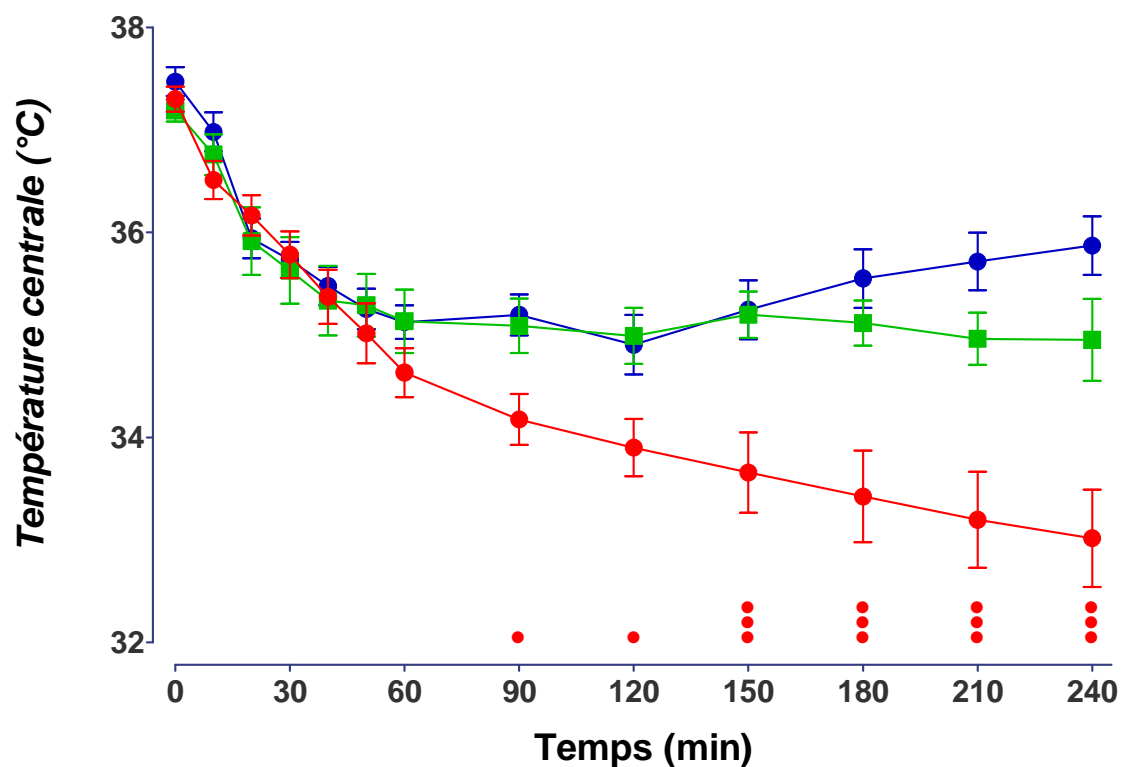


Figure 20 : Evolution de la température centrale au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : T8 (bleu), T8E1 (vert) et T8E3 (rouge). Seules les significativités entre T8 et T8E1 (●) et entre T8 et T8E3 (●) ont été représentées.

Seuls les groupes Témoin et E1 sont restés normothermes, tous les autres ont présenté une hypothermie. Ainsi les groupes T8, T8E1 et E3 présentaient dès 10 à 20 min et jusqu'à la fin de l'expérimentation des hypothermies ($p < 0,05$ à $p < 0,001$ par rapport au groupe Témoin), mais celles-ci ne se sont pas significativement distinguées entre elles. Par contre, l'association de 3 g.kg^{-1} d'éthanol à la dose de THC a provoqué chez le groupe T8E3 une hypothermie plus intense, significativement différente des autres dès 90 min ($p < 0,05$ à $p < 0,001$) qui s'intensifiait encore à 240 min (**Figure 20**).

2.2 Paramètres respiratoires

Comme lors de l'étude des effets respiratoires de l'éthanol :

- Le groupe E1 n'a pas présenté de différences significatives avec le groupe Témoin pour les paramètres de respiration.
- Le groupe E3 a présenté une augmentation significative de la fréquence respiratoire entre 10 et 50 min ($p < 0,05$ à $p < 0,01$).

Comme attendu, le groupe T8 a respiré plus lentement que le groupe Témoin : baisse de f , de 10 à 240 min ($p < 0,05$), avec une augmentation du T_I , de 50 à 240 min ($p < 0,05$ à $p < 0,001$) et augmentation de V_T de 150 à 210 min ($p < 0,05$ à $p < 0,01$), V_E étant conservé.

Le groupe T8E1 ne se distingue jamais de T8, il présente les mêmes variations par rapport à la respiration des animaux Témoins.

La respiration du groupe T8E3 se distingue de celle de T8 de deux façons :

- Premièrement, à 10 min et 150 min, ils présentent une f plus élevée avec un T_E plus court et conséquemment un T_{TOT} raccourci ($p < 0,05$ à $p < 0,001$) (**Figure 21a**). A ces mêmes temps, 10 min et 150 min, alors que par ailleurs ils respiraient plus lentement (de 20 à 120 min, $p < 0,05$ à $p < 0,001$), la fréquence des animaux de T8 n'étaient plus significativement différents de ceux de E3, alors que les T_E de T8E3 ne sont jamais significativement différents de ceux d'E3 (**Figure 22**).
- Enfin, très rapidement le groupe T8E3 présente une baisse de V_T , significativement différente de T8 et T8E1 dès 40 min ($p < 0,01$ à $p < 0,001$), accompagnée d'une tendance à la baisse de V_E . Le débit inspiratoire de T8E3 présente une tendance à la baisse qui devient significative entre 180 et 210 min. (**Figure 21b**).

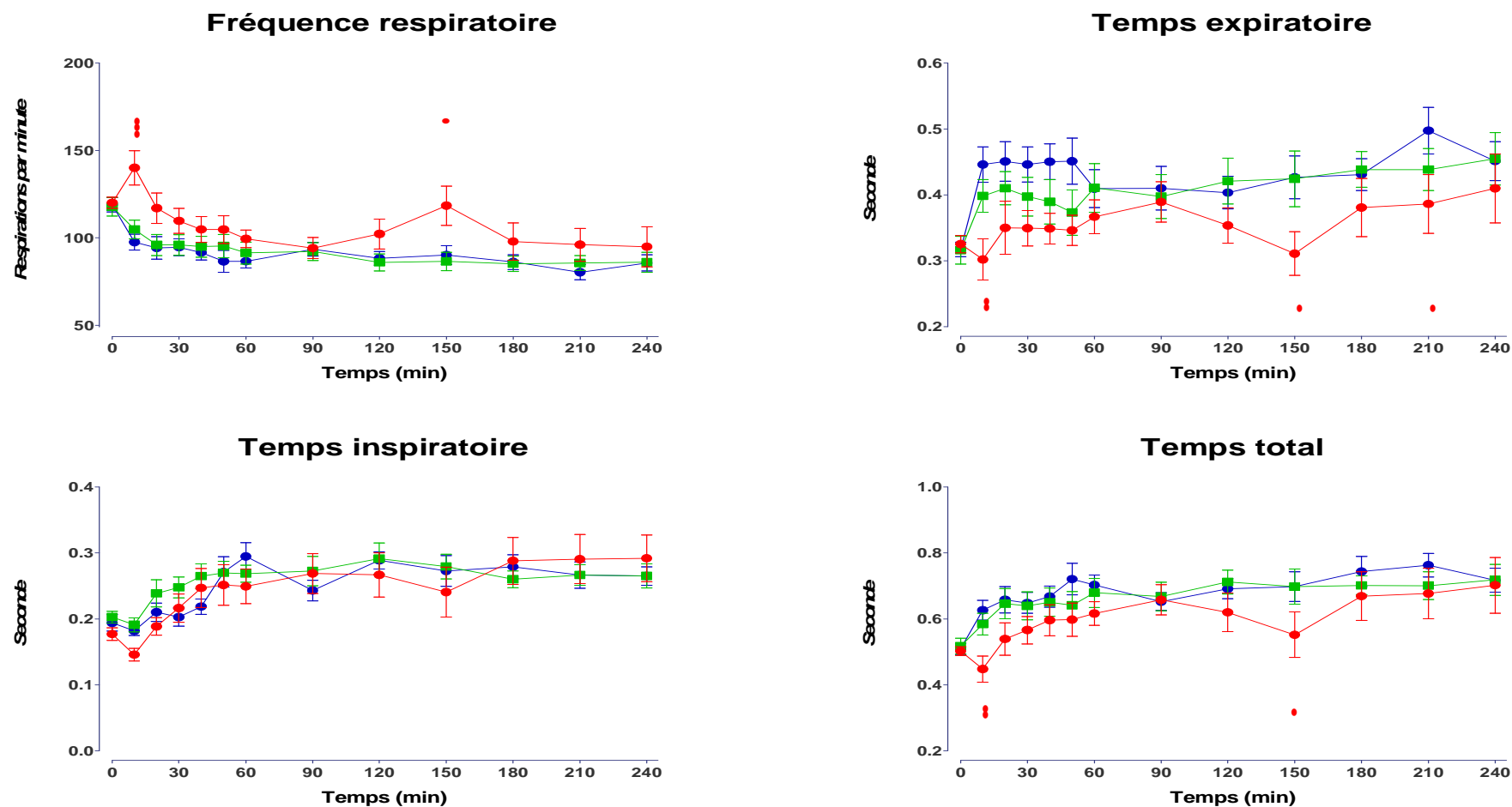


Figure 21a : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : T8 (bleu), T8E1 (vert) et T8E3 (rouge). Seules les significativités entre T8 et T8E1 (●) et entre T8 et T8E3 (●) ont été représentées.

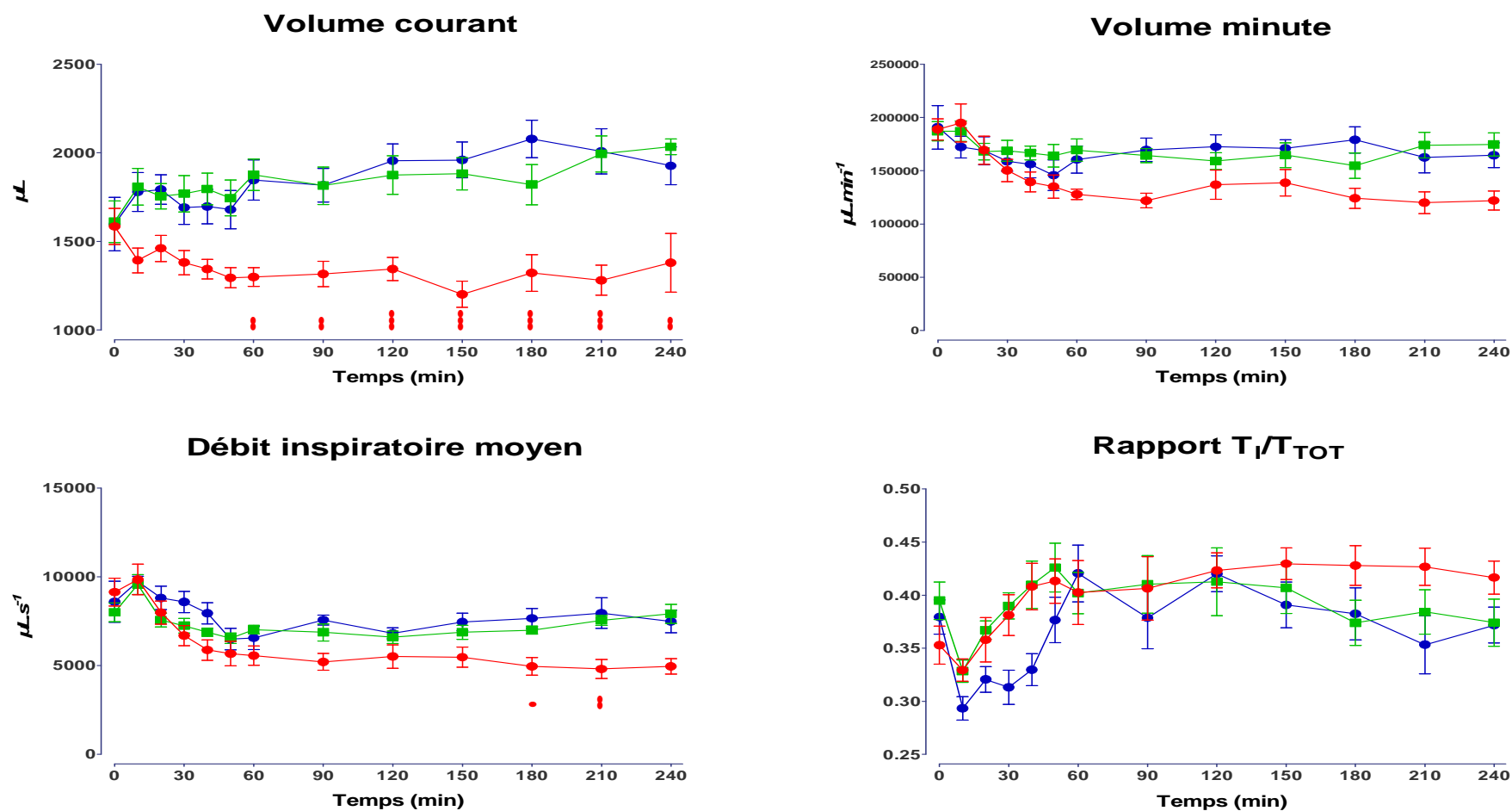


Figure 21b : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : T8 (bleu), T8E1 (vert) et T8E3 (rouge). Seules les significativités entre T8 et T8E1 (●) et entre T8 et T8E3 (●) ont été représentées.

Les animaux du groupe T8E3 ont respiré sensiblement à la même vitesse que les autres animaux ayant reçu du THC (sauf à 10 et 150 min) mais des volumes plus faibles.

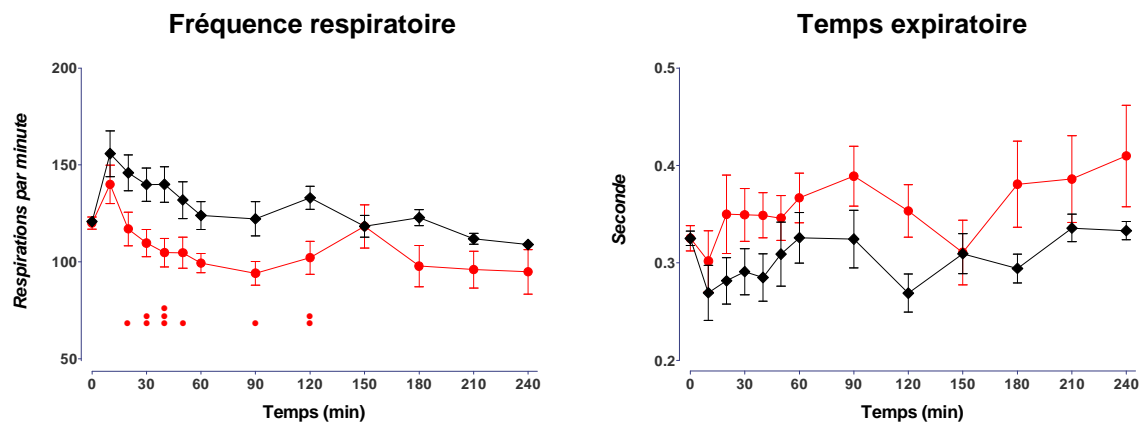


Figure 22 : Evolution de la fréquence respiratoire et du temps expiratoire au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : E3 (noir) et T8E3 (rouge). Seules les significativités entre T8E3 et E3 (●) ont été représentées.

Chapitre 4 : études des effets respiratoires de l'acide γ -hydroxybutyrique

1 Etude C1 : Détermination de la DL_{50}

La DL_{50} a été calculée à : $2,18 \pm 0,23 \text{ g.kg}^{-1}$ [$1,94 - 2,66 \text{ g.kg}^{-1}$].

Lors de cette étude, les animaux sont rapidement devenus comateux, pendant ce coma certains animaux ont uriné ou déféqué de façon marquée. A leur réveil, les survivants sont restés prostrés avant de retrouver une activité normale en moins de 24 heures. Après le premier jour, les animaux sont asymptomatiques. Les décès ne sont survenus que lors de la période de coma.

2 Etude C2 : Cinétiques sanguines artérielles du GHB

Les animaux sont distribués entre 4 groupes ($n = 3$) : un groupe Témoin et 3 groupes GHB recevant une dose de 0,1 ; 0,3 ou 1 g.kg^{-1} de GHB.

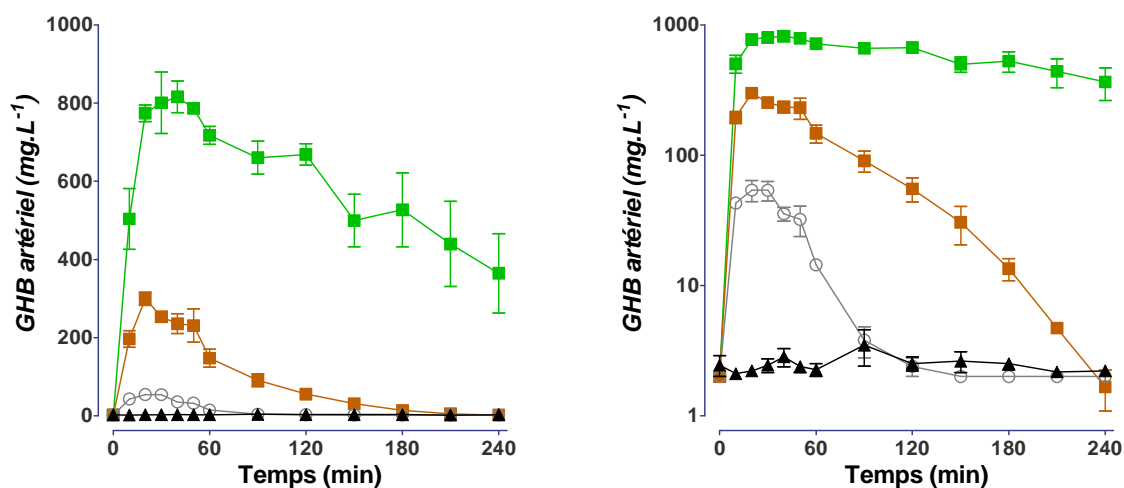


Figure 23 : Représentation linéaire (gauche) et semi-logarithmique (droite) des concentrations artérielles moyennes en GHB après l'administration IP de GHB pour les groupes Témoins (noir), 100 mg.kg⁻¹ (gris ouvert), 300 mg.kg⁻¹ (marron) et 1000 mg.kg⁻¹ (vert).

Les concentrations sanguines déterminées sont représentées en **Figure 23**. Les paramètres cinétiques artériels apparents sont reportés dans le **Tableau 17**. L'AUC_{0→240}, le C_{max} et le T_{max} croissent avec la dose alors que CL/F_{IP} diminue.

Tableau 17 : Paramètres cinétiques artériels apparents après l'administration IP de GHB

Paramètre	Dose (mg.kg ⁻¹)		
	100	300	1000
AUC _{0→240} (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)	2,88±0,38	21,4±1,8	140±22 ^a
C _{max} (mg.L ⁻¹)	60,2±15,0	306±27 ^b	878±81 ^a
T _{max} (min)	20 [20-30]	20 [20-50]	30 [20-40]
CL/F _{IP} (L.min ⁻¹ .kg ⁻¹)	0,035±0,005	0,014±0,001 ^b	NA

^a p < 0,001 par rapport aux valeurs du groupe 100 mg.kg⁻¹

^b p < 0,01 par rapport aux valeurs du groupe 100 mg.kg⁻¹

La modélisation de population a aboutit à un modèle mathématique identique à celui de l'éthanol : modèle à 1 compartiment avec absorption d'ordre 1 et élimination de type Mickaelis-Menten de formule (**Tableau 18, Figure 24, Figure 25 & Figure 26**) :

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{\frac{V_{\max}}{Vd / F_{IP}} \times C}{Km + C} + \text{entrée} \quad \text{dont} \quad \text{entrée}(t) = \frac{D}{Vd / F_{IP}} ka e^{-ka(t)}$$

C : concentration (mg.L⁻¹) ; V_{max} : vitesse maximale d'élimination (mg.kg⁻¹.min⁻¹) ; Vd/F_{IP} : volume apparent de distribution (L.kg⁻¹) ; Km : constante de Michaelis-Menten (mg.L⁻¹) ; D : dose (mg.kg⁻¹) ; ka : constante d'absorption (min⁻¹). La variabilité sur ka et Km a été ôtée.

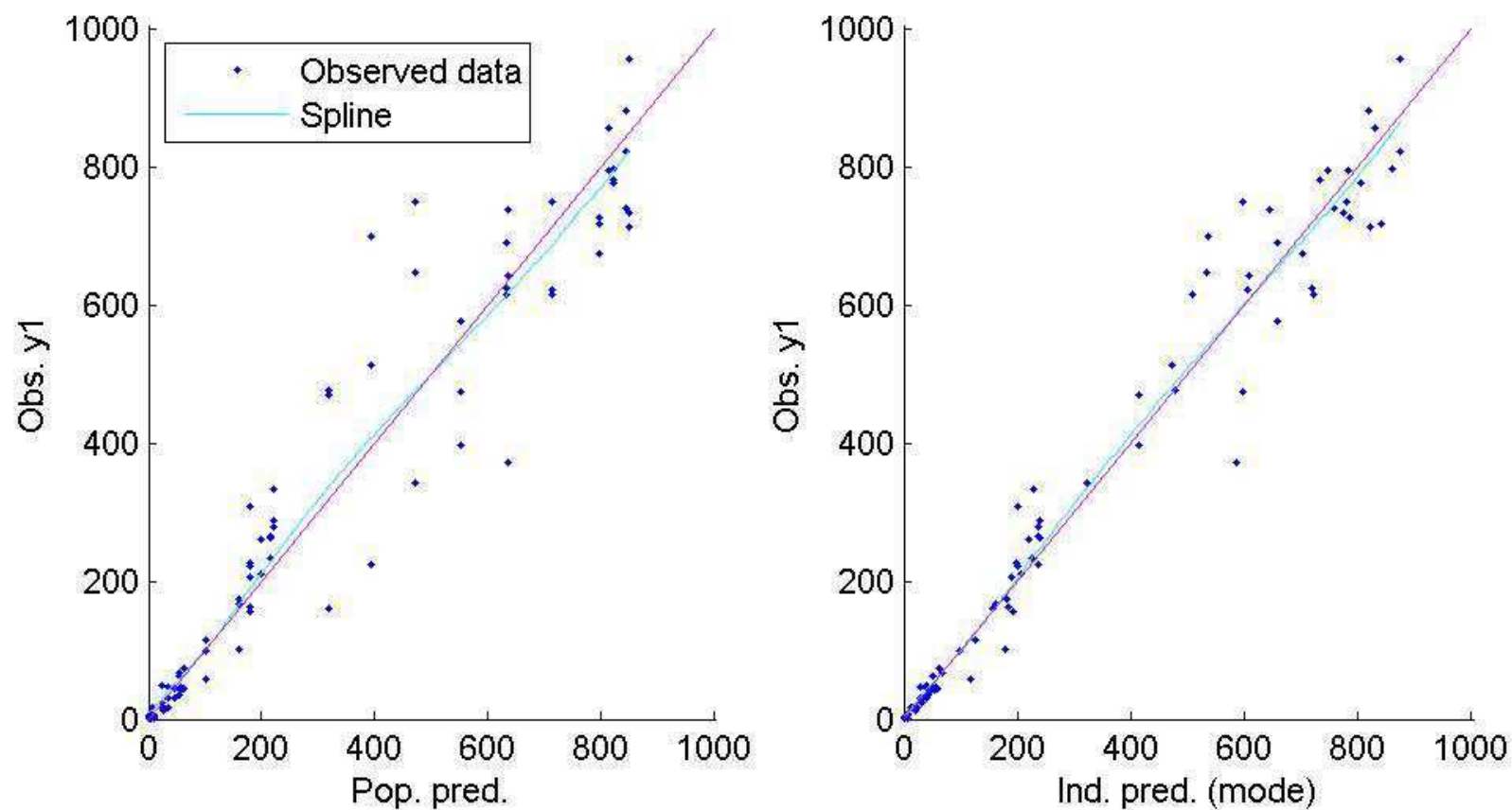


Figure 24 : Evaluation du modèle à 1 compartiment avec absorption d'ordre 1 et élimination de type Mickaelis-Menten. Corrélation des données observées aux prédictions de population (gauche) et aux prédictions individuelles (droite)

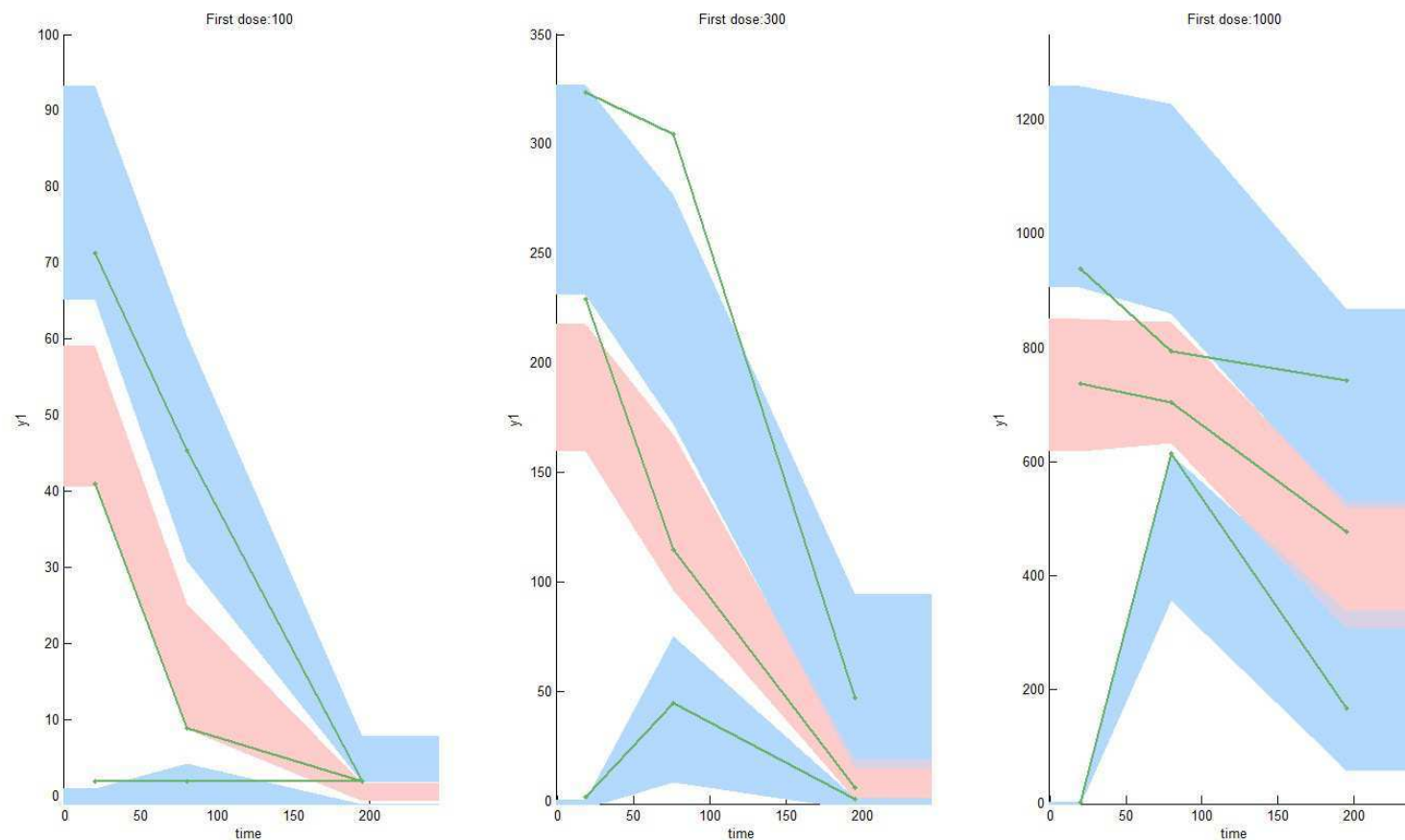


Figure 25: Evaluation du modèle à 1 compartiment avec absorption d'ordre 1 et élimination de type Mickaelis-Menten. Les lignes vertes représentent les percentiles empiriques correspondants aux données observées, les zones bleues et rose représentent les 5^{ème}, 50^{ème} et 95^{ème} percentiles des prédictions.

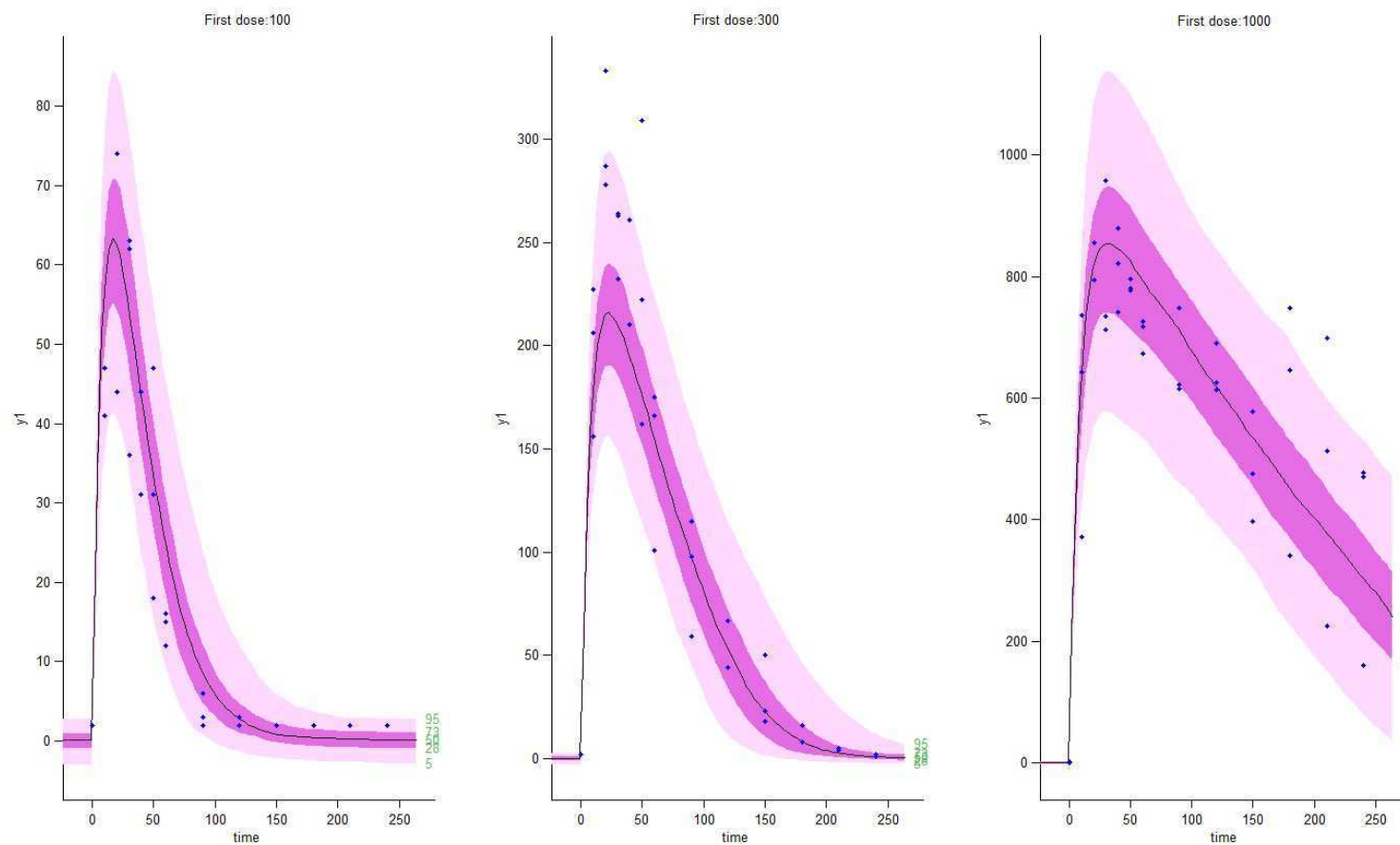


Figure 26 : Evaluation du modèle à 1 compartiment avec absorption d'ordre 1 et élimination de type Mickaelis-Menten. Les points bleus représentent les observations, les zones roses claire et foncé respectivement les 5^{ème}, 50^{ème} et 95^{ème} percentiles des prédictions.

Tableau 18: Paramètres pharmacocinétiques de population du GHB après administration IP pour des rats mâles Sprague-Dawley.

Paramètre	Estimation moyenne (RSE [%])
Modèle final	
Modèle structural	
k_a (min^{-1})	0,116 (13)
V_d/F_{IP} (L.kg^{-1})	1,04 (4)
V_{\max} ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	3,14 (12)
K_m (mg.L^{-1})	70,5 (23)
Modèle statistique	
a (mg.L^{-1})	1,82 (14)
b	0,181 (9)
ω_v	0,084 (39)
ω_{vm}	0,21 (26)

Avec ω estimateur de la variabilité interindividuelle

3 Paramètres respiratoires

3.1 Etude C3 : Paramètres respiratoires en ventilation de repos

Les animaux sont distribués entre 6 groupes ($n = 8$) : un groupe Témoin et 5 groupes GHB recevant une dose de 0,1 ; 0,3 ; 0,6 ; 1 ou 1,6 g.kg^{-1} de GHB.

3.1.1 Signes cliniques

Les animaux des groupes témoins et 100 mg.kg^{-1} étaient asymptomatiques. Tous se sont endormis à certains moments de l'étude.

Dans le groupe 300 mg.kg^{-1} , certains animaux étaient asymptomatiques (4/8), à l'exception de l'endormissement, alors que d'autres étaient comateux (4/8). Ces derniers ont présenté

individuellement une tendance à l'hypothermie et se sont tous brutalement réveillés en moins de 2 heures.

Aux autres doses (600 à 1600 mg.kg⁻¹), tous les individus ont présenté une phase de sédation d'une durée s'accroissant avec la dose :

- à 600 mg.kg⁻¹ : réveil brutal entre 90 et 120 min ;
- à 1000 mg.kg⁻¹ : réveil brutal entre 150 et 240 min, un individu était toujours dans le coma à 240 min ;
- à 1600 mg.kg⁻¹ : réveil brutal entre 150 et 240 min, cinq individus étaient toujours dans le coma à 240 min ;

et une tendance à l'évolution triphasique de la température avec un enchaînement : hypothermie, hyperthermie et hypothermie (**Figure 27**).

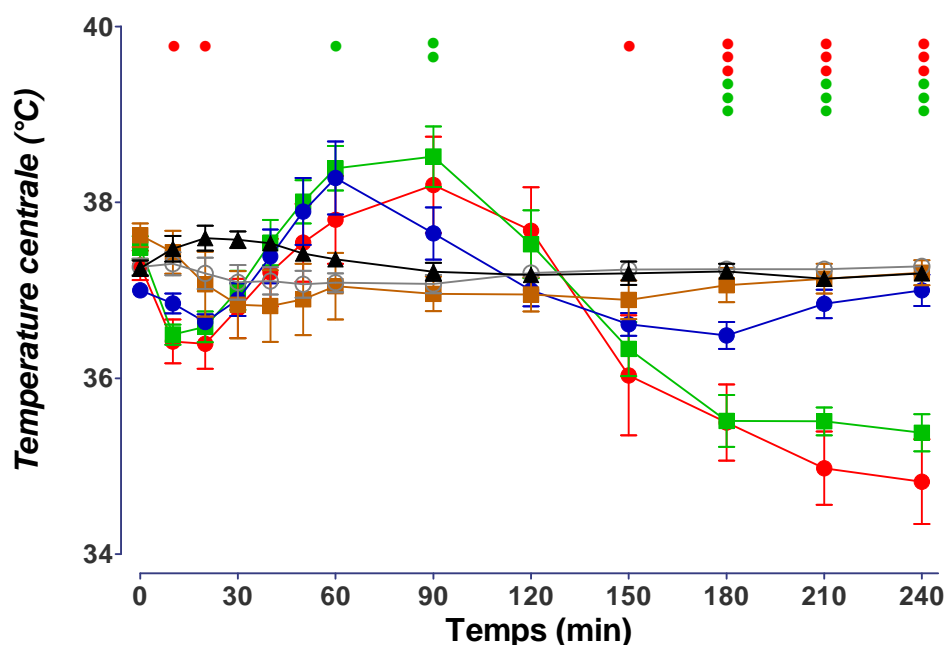


Figure 27 : Evolution de la température centrale au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB pour les groupes Témoins (noir), 100 mg.kg⁻¹ (gris ouvert), 300 mg.kg⁻¹ (marron), 600 mg.kg⁻¹ (bleu), 1000 mg.kg⁻¹ (vert) et 1600 mg.kg⁻¹ (rouge).

3.1.2 Paramètres respiratoires

Les animaux du groupe 100 mg.kg⁻¹ ne se sont pas distingués du groupe Témoin (*Figure 28a & Figure 28b*). Si la dose de 300 mg.kg⁻¹ de GHB n'a provoqué aucune modification significative de la respiration, une tendance aux mêmes effets qu'à plus forte dose s'est dessinée. Ainsi, aux doses de 600, 1000 et 1600 mg.kg⁻¹, les rats respiraient plus lentement, baisse de la f ($p < 0,05$ à $p < 0,001$ de 10 à 240 min selon les groupes), et plus profondément, augmentation de V_T ($p < 0,05$ à $p < 0,001$ de 10 à 180 min selon les groupes), avec conservation du V_E , qui est demeuré quasiment constant. Le T_{TOT} s'est accru de façon différentielle avec une augmentation plus précoce et plus durable de T_I (10 à 210 minutes : $p < 0,05$ à $p < 0,001$) que de T_E (20 à 150 minutes : $p < 0,05$ à $p < 0,001$), la composante inspiratoire (rapport T_I/T_{TOT}) était augmentée dans les 20 premières minutes ($p < 0,05$ à $p < 0,001$) et après 2 heures.

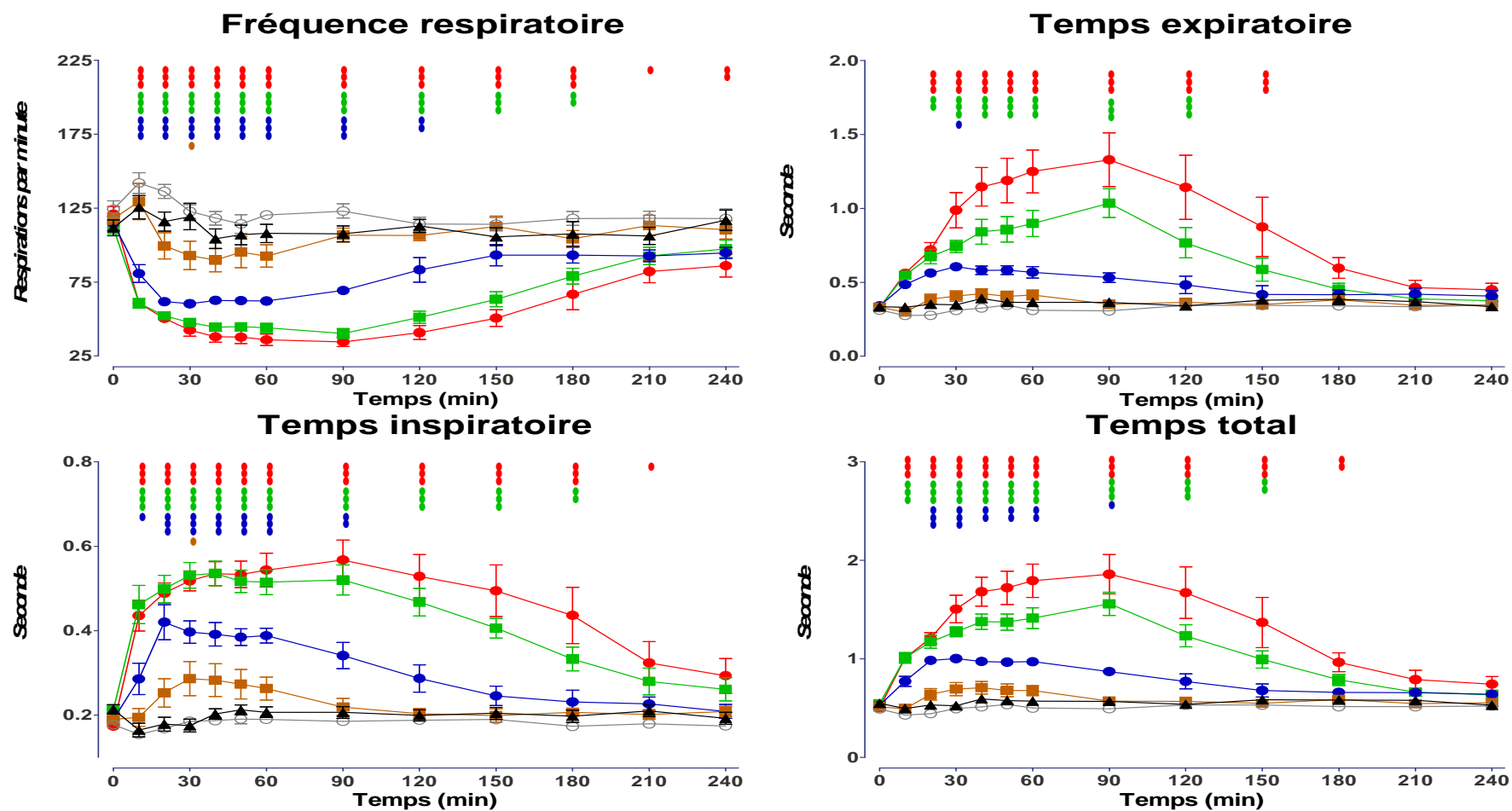


Figure 28a : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB pour les groupes Témoins (noir), 100 mg.kg⁻¹ (gris ouvert), 300 mg.kg⁻¹ (marron), 600 mg.kg⁻¹ (bleu), 1000 mg.kg⁻¹ (vert) et 1600 mg.kg⁻¹ (rouge).

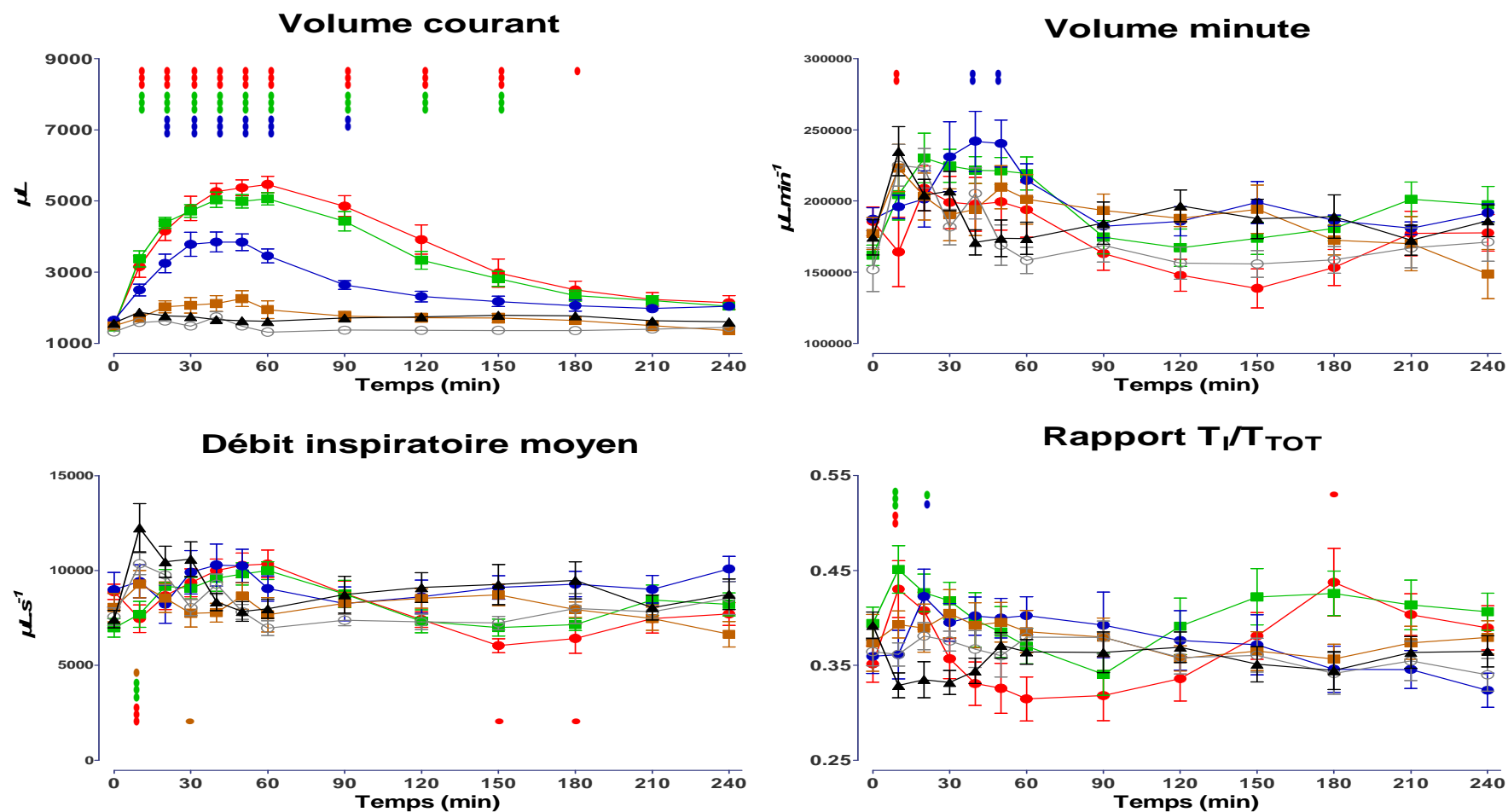


Figure 28b : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB pour les groupes Témoins (noir), 100 mg.kg⁻¹ (gris ouvert), 300 mg.kg⁻¹ (marron), 600 mg.kg⁻¹ (bleu), 1000 mg.kg⁻¹ (vert) et 1600 mg.kg⁻¹ (rouge).

L'observation des tracés pléthysmographiques obtenus lors des périodes de bradypnées et leur comparaison aux tracés de respiration normale (**Figure 29**) nous ont incités à distinguer les phases inspiratoires et expiratoires vraies des apnées.

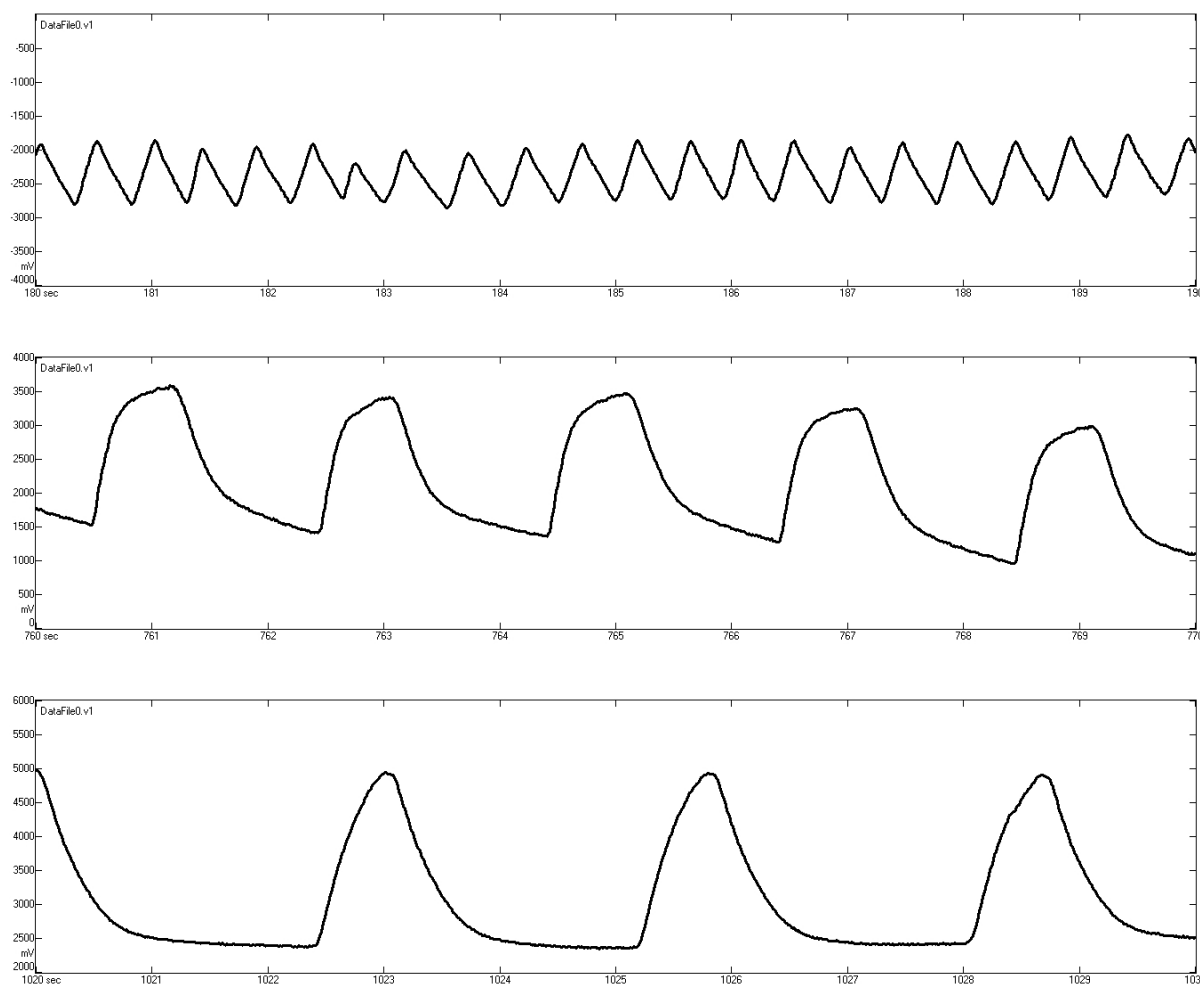


Figure 29 : Extraits de pléthysmogrammes obtenus lors de l'étude des effets respiratoires de la dose de 1600 mg.kg^{-1} de GHB : en haut, respiration avant administration de la dose de GHB ($f \sim 120 \text{ respirations.min}^{-1}$) ; au milieu, près de 40 minutes après l'administration ($f \sim 30 \text{ respirations.min}^{-1}$) ; en bas près de 90 minutes après l'administration ($f \sim 20 \text{ respirations.min}^{-1}$).

Ainsi, dans une seconde étape, nous avons distingué : T_I , T_{IC} , A_I , T_E , T_{EC} et A_E . Ces données ont été représentées en **Figure 30**, **Figure 31** et **Figure 32**.

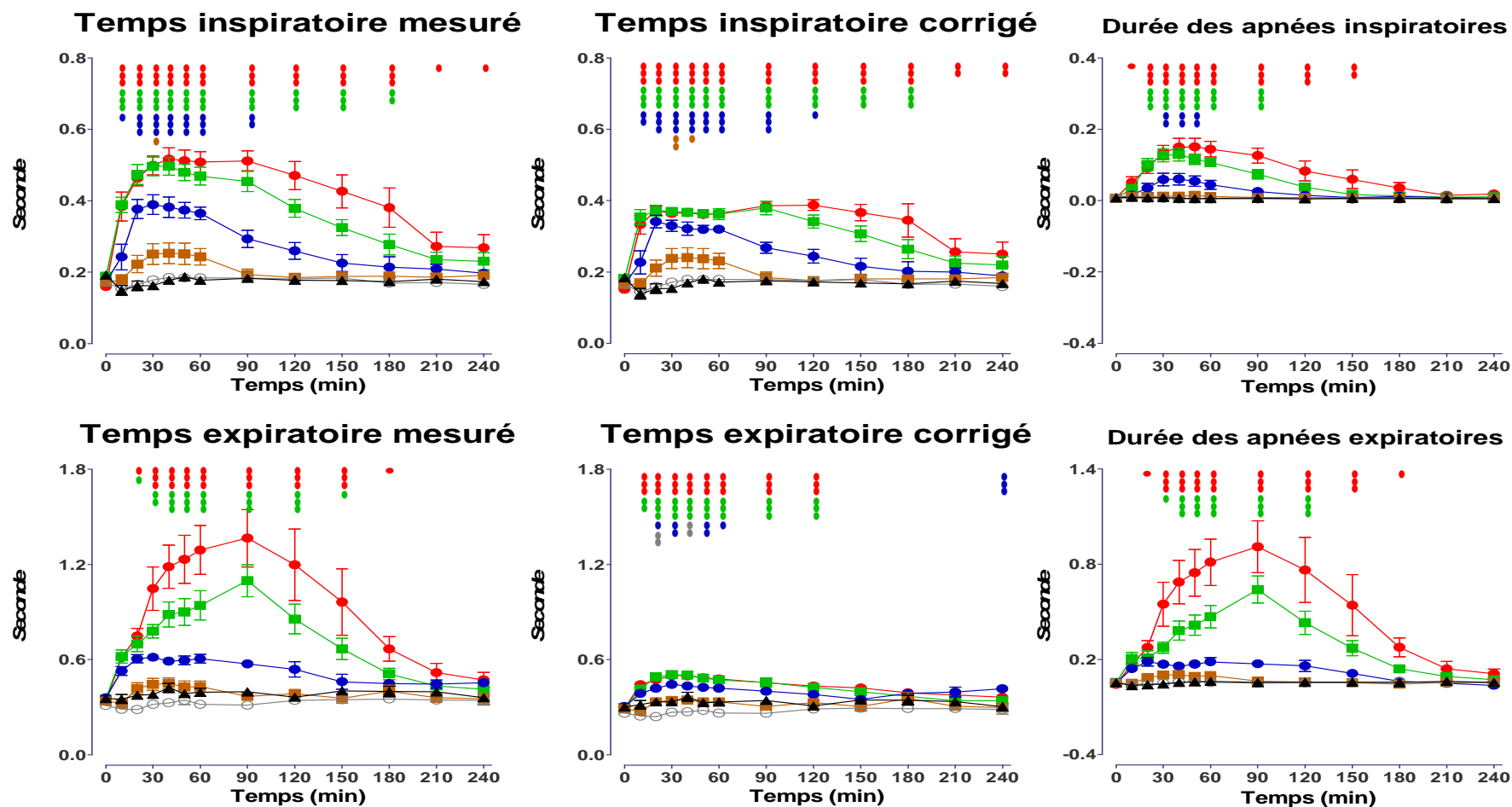


Figure 30 : Evolution des temps mesurés et corrigés, et des durées des apnées, inspiratoires et expiratoires, au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB pour les groupes Témoins (noir), 100 mg.kg⁻¹ (gris ouvert), 300 mg.kg⁻¹ (marron), 600 mg.kg⁻¹ (bleu), 1000 mg.kg⁻¹ (vert) et 1600 mg.kg⁻¹ (rouge).

Dans la **Figure 30**, tous les graphiques d'une même ligne ont été représentés dans une échelle équivalente afin d'apprécier la proportion du phénomène apnéique. Ainsi, dans la phase inspiratoire, A_I reste minoritaire par rapport à T_{IC} (T_{IC} maximal : 0,39s ; A_I maximale : 0,15s) ; à l'opposé, dans la phase expiratoire, A_E est largement majoritaire (T_{EC} maximal : 0,50s ; A_E maximale : 0,91s).

Dans la **Figure 31**, l'évolution des T_{IC} et T_{EC} a été représentée dans une échelle plus adaptée à l'observation des différences entre les groupes. Ces deux paramètres ont crû avec la dose mais un maximum d'intensité est atteint entre 600 et 1000 mg.kg⁻¹. Les doses provoquant 50 % de l'effet ont été établies à 470 mg.kg⁻¹ pour T_{IC} et à 450 mg.kg⁻¹ pour T_{EC} . L'accroissement des doses a par contre une action différente sur la durée des modifications observées, ainsi la durée de l'effet sur T_{IC} a crû linéairement avec la dose, mise en évidence par l'augmentation linéaire de l'AUC avec la dose ; alors que la durée de l'effet sur T_{EC} a crû jusqu'à un maximum entre 600 et 1000 mg.kg⁻¹ comme pour les maxima. Il est notable par ailleurs que l'administration de GHB a provoqué une baisse du T_{EC} aux faibles doses avant son accroissement avec la dose.

L'évolution de la durée des apnées a été reprise dans une échelle plus adaptée à la comparaison intergroupes en **Figure 32**. L'accroissement des doses a provoqué une augmentation de A_I et A_E , plus la dose était importante plus l'apnée durait. Ces phénomènes n'ont pas atteint un niveau de saturation, les doses provoquant 50% des effets n'ont pu être établies. La cinétique de cet effet est différente entre les deux apnées, l'augmentation maximale a été observée pour A_I entre 30 et 50 minutes, pour A_E , vers 90 minutes.

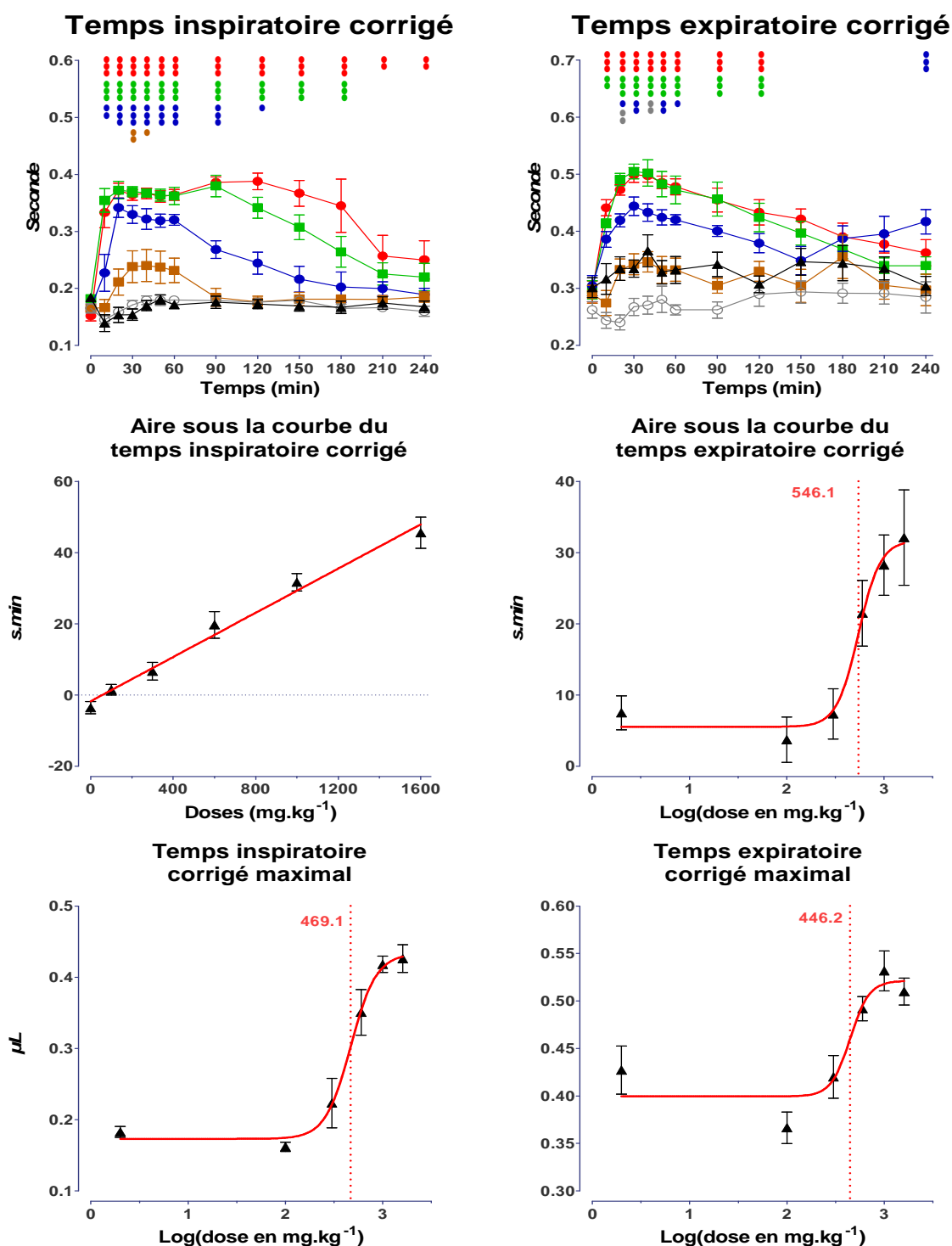


Figure 31 : [haut] Evolution des T_{IC} et T_{EC} au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB pour les groupes Témoin (noir), 100 mg.kg⁻¹ (gris ouvert), 300 mg.kg⁻¹ (marron), 600 mg.kg⁻¹ (bleu), 1000 mg.kg⁻¹ (vert) et 1600 mg.kg⁻¹ (rouge). – [milieu] Evolution des aires sous la courbe des T_{IC} et T_{EC} en fonction de la dose de GHB – [bas] Evolution des maxima des T_{IC} et T_{EC} en fonction de la dose de GHB.

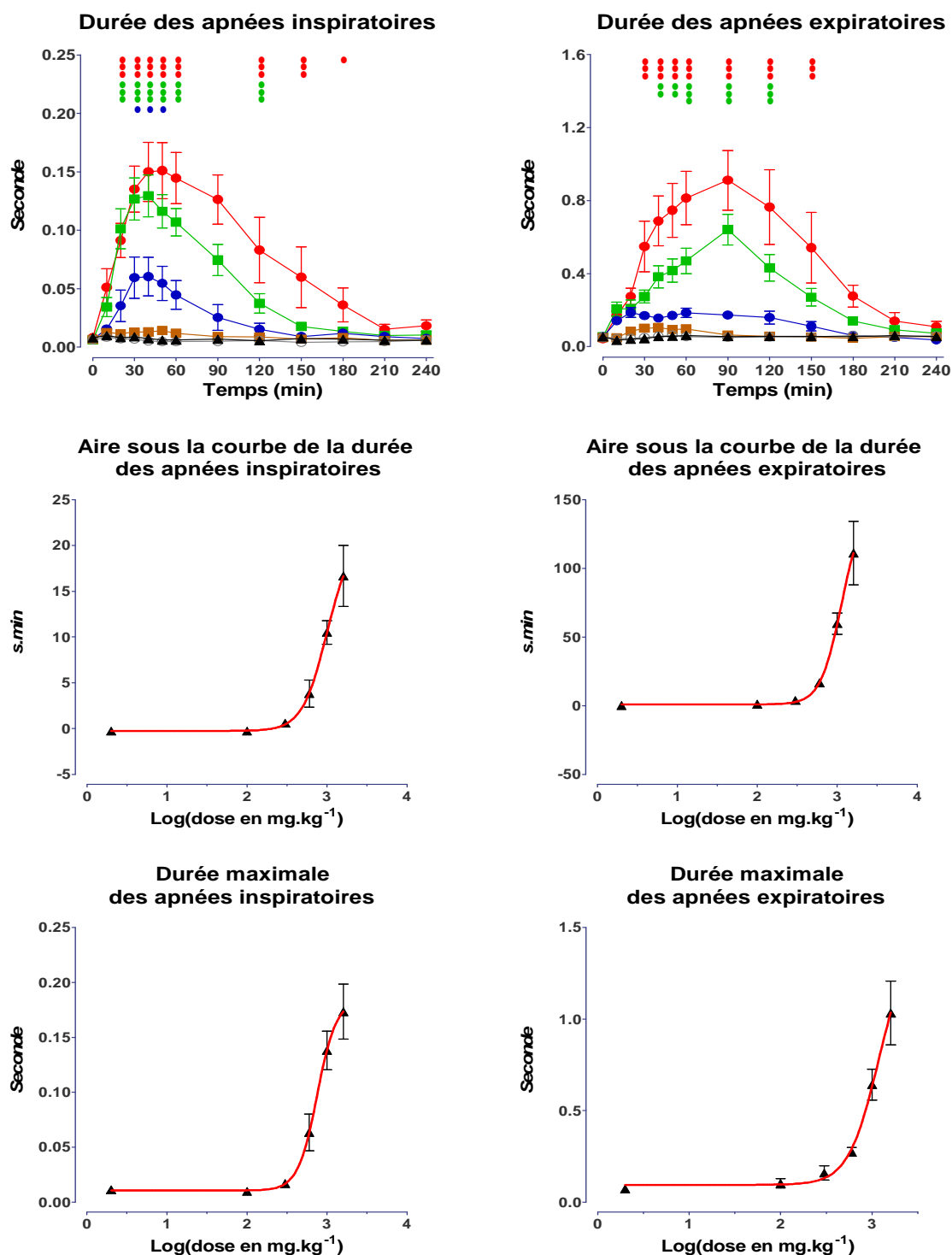


Figure 32 : [haut] Evolution de la durée des apnées inspiratoire et expiratoire au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB pour les groupes Témoin (noir), 100 mg.kg⁻¹ (gris ouvert), 300 mg.kg⁻¹ (marron), 600 mg.kg⁻¹ (bleu), 1000 mg.kg⁻¹ (vert) et 1600 mg.kg⁻¹ (rouge) – [milieu] Evolution des aires sous la courbe des A_I et A_E en fonction de la dose de GHB – [bas] Evolution des maxima des A_I et A_E en fonction de la dose de GHB.

3.2 Etude C4 : Gaz du sang en ventilation de repos

Les animaux sont distribués entre 4 groupes ($n \geq 3$) : un groupe Témoin et 3 groupes GHB recevant une dose de 0,1 ; 0,3 ou 1 g.kg⁻¹ de GHB.

3.2.1 Signes cliniques

Comme durant l'étude pléthysmographique, seuls les animaux du groupe 1000 mg.kg⁻¹ ont présenté une altération sévère de la conscience, score proche de 3, dès 10 minutes et jusqu'à la fin de l'expérimentation. Cette altération de la conscience est contemporaine d'une tendance à une évolution triphasique de la température rectale (*Figure 33 & Figure 34*).

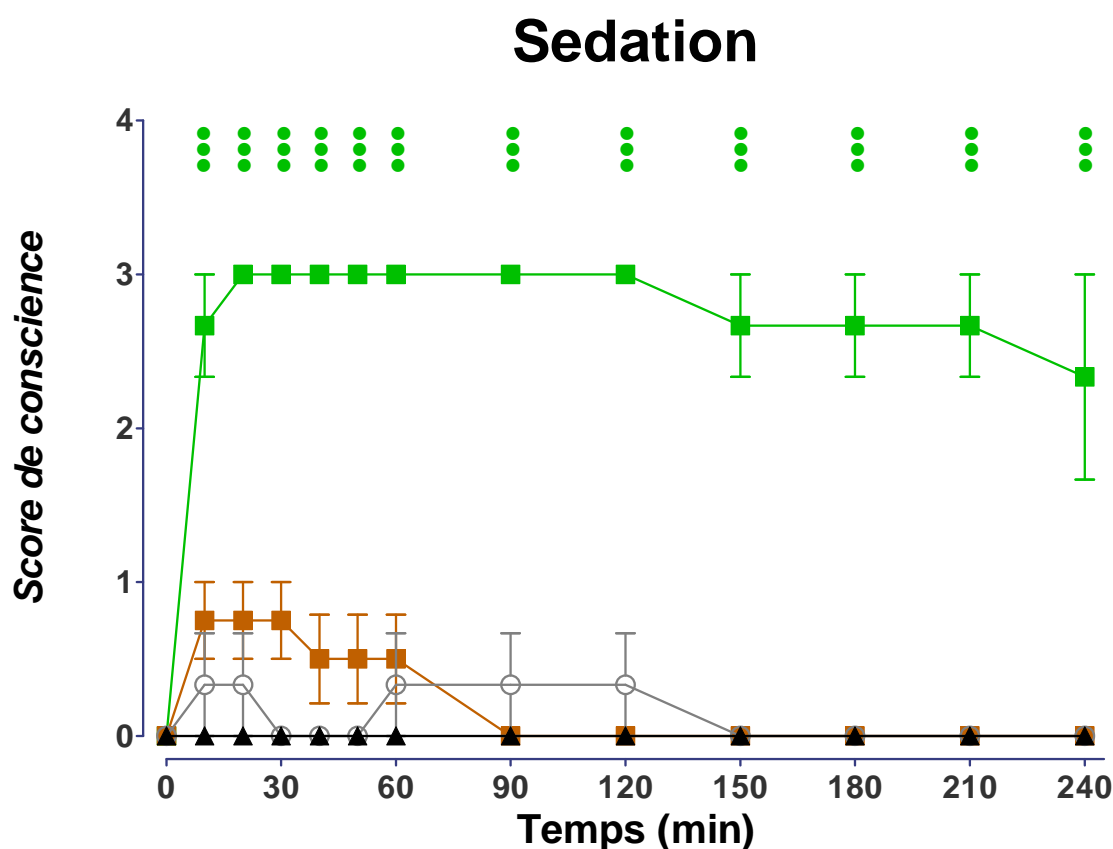


Figure 33 : Evolution du score de conscience au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB pour les groupes Témoins (noir), 100 mg.kg⁻¹ (gris ouvert), 300 mg.kg⁻¹ (marron) et 1000 mg.kg⁻¹ (vert)

Les rats des groupes témoin et 100 mg.kg⁻¹ n'ont pas présenté de variations significatives de leur température rectale. Les groupes 300 et 1000 mg.kg⁻¹ ont présenté une hypothermie significative, la courbe de température du groupe 1000 mg.kg⁻¹ suivant une évolution triphasique, comme lors de l'étude pléthysmographique, mais non significative (*Figure 34*).

3.2.2 Gaz du sang

Le groupe 100 mg.kg⁻¹ n'a pas présenté de différence significative avec le groupe Témoin. Une alcalose est survenue après la deuxième heure chez les animaux des groupes à 300 et 1000 mg.kg⁻¹, ces alcaloses sont accompagnées d'une augmentation des concentrations en bicarbonates sanguins. Une baisse isolée de la PaO₂ a aussi été relevée (*Figure 34*).

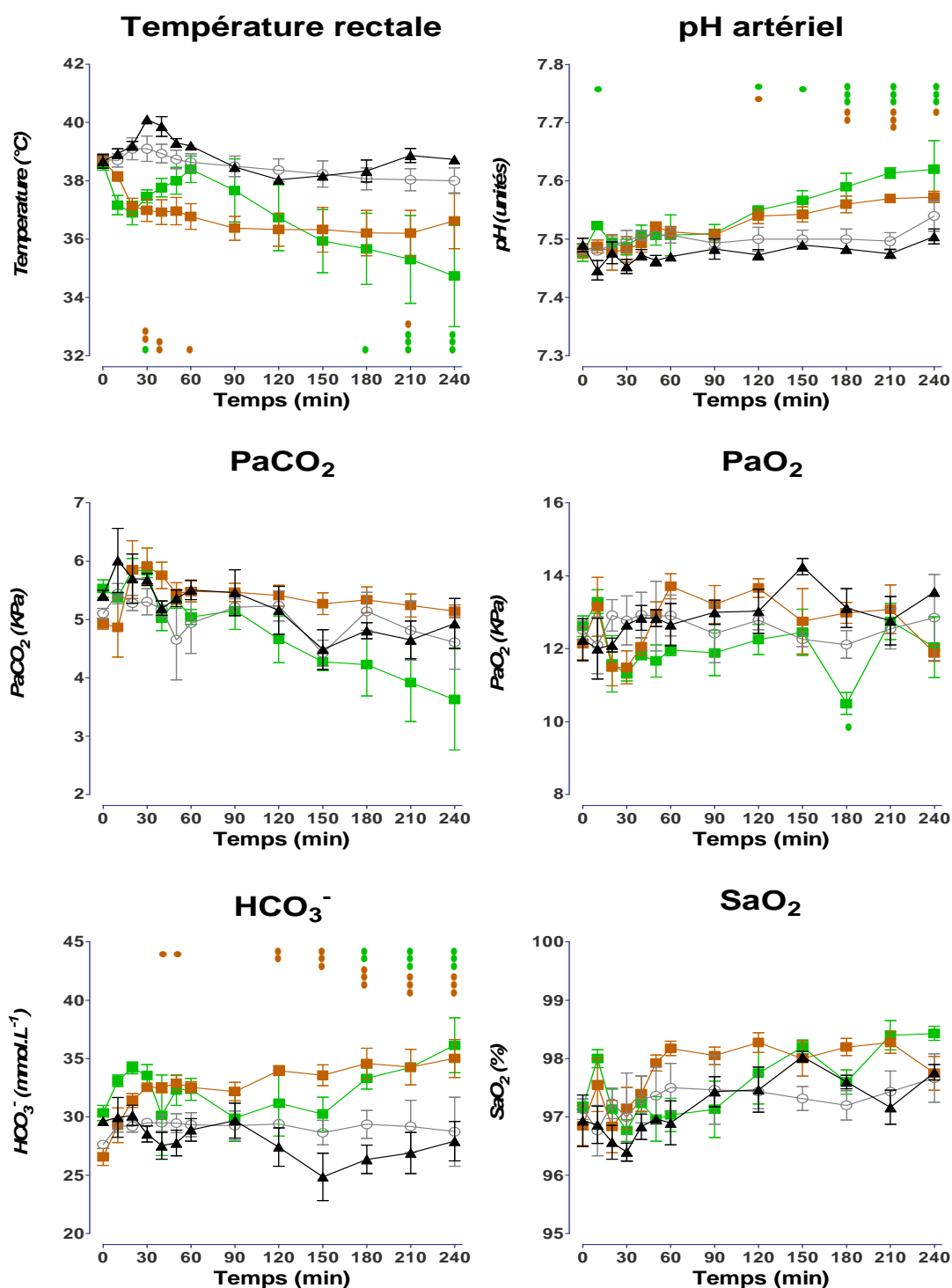


Figure 34 : Evolution de la température rectale et des paramètres des gaz du sang au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB pour les groupes Témoin (noir), 100 mg.kg⁻¹ (gris ouvert), 300 mg.kg⁻¹ (marron) et 1000 mg.kg⁻¹ (vert). Les paramètres des gaz du sang sont corrigés selon la température rectale.

3.3 Etude C5 : Paramètres respiratoires lors des hypercapnies exogènes

Les animaux sont distribués entre 2 groupes ($n = 5$) : un groupe Témoin et un groupe GHB recevant une dose de $0,3 \text{ g.kg}^{-1}$ de GHB.

3.3.1 Signes cliniques

Comme lors de l'étude en ventilation de repos, les animaux témoins étaient asymptomatiques et les animaux ayant reçu une dose de 300 mg.kg^{-1} de GHB étaient, soit asymptomatiques (1/5), soit sédatisés (4/5), dans ce dernier cas, ils ont aussi présentés une hypothermie (*Figure 35*).

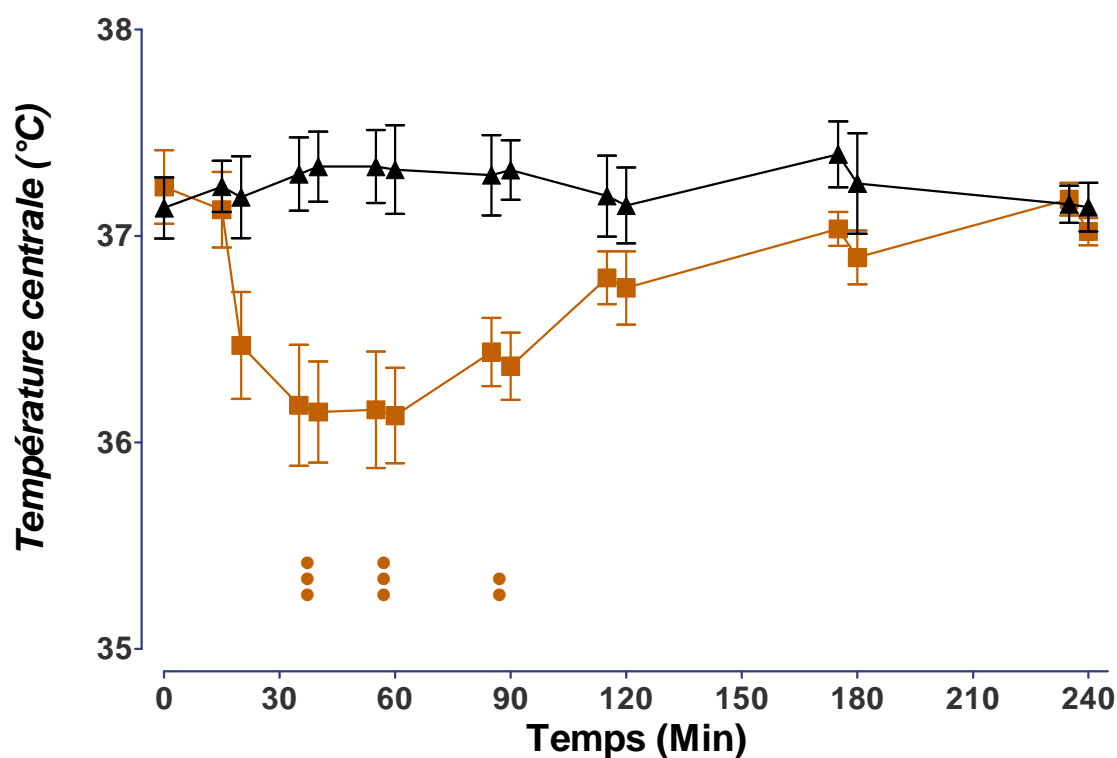


Figure 35 : Evolution de la température centrale au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB lors de l'épreuve d'hypercapnie exogène intermittente pour les groupes Témoin (noir) et 300 mg.kg^{-1} (marron).
A l'exception de T0, chaque paire de points consiste en la mesure en air puis 5 min après en la mesure en condition d'hypercapnie exogène.

3.3.2 Paramètres respiratoires

Lors des étapes en air, les animaux ayant reçu du GHB ont présenté une augmentation du T_I et du rapport T_I/T_{TOT} dans les 40 premières minutes, les autres paramètres n'étant pas différents. Une augmentation non significative du T_I avait été observée lors de l'étude en ventilation de repos.

Tableau 19 : Comparaison des valeurs basales des paramètres respiratoires en air et en hypercapnie exogène (5% CO_2) lors de l'étude des effets respiratoires du GHB

	Valeur basale en air (n=10)	Valeur en hypercapnie exogène (n=10)	Valeur de p du test t de Student par séries appariées	Pourcentage de variation
Fréquence respiratoire (f) en respiration par min	115,6 ± 3,5	163,1 ± 2,5	<0,0001	+ 41 %
Temps expiratoire (T_E) en s	0,332 ± 0,014	0,198 ± 0,004	<0,0001	- 40 %
Temps inspiratoire (T_I) en s	0,206 ± 0,016	0,171 ± 0,004	0,0459	- 17 %
Temps total (T_{TOT}) en s	0,523 ± 0,016	0,369 ± 0,006	<0,0001	- 29 %
Volume courant (V_T) en μL	1647 ± 88	2480 ± 126	<0,0001	+ 51 %
Volume minute (V_E) en $\mu L \cdot min^{-1}$	189100 ± 8523	405700 ± 24070	<0,0001	+ 115 %
Débit inspiratoire moyen en $\mu L \cdot s^{-1}$	8343 ± 688	14630 ± 856	<0,0001	+ 75 %
Rapport T_I/T_{TOT} (sans unité)	0,394 ± 0,029	0,463 ± 0,008	0,0344	+ 18 %

L'hypercapnie exogène a provoqué à t_0 une accélération de la respiration avec augmentation des volumes mobilisés : baisse moyenne de 27% de T_{TOT} , de 10% de T_I , de 36% de T_E ; augmentation moyenne de 40% de f, de 47% du V_T , de 105% du V_E , de 66% du débit inspiratoire moyen, de 24% de la part inspiratoire dans un cycle respiratoire (**Tableau 19**). Ces modifications des valeurs basales sont comparables à celles observées lors de l'étude des effets de l'alcool en hypercapnie exogène (**Cf. 3.3**).

En hypercapnie exogène (**Figure 36**), au cours de la première heure, les rats sous GHB ont respirés plus lentement, baisse de f , et plus profondément, augmentation de V_T , que les témoins tout en conservant leur V_E . L'augmentation de T_I et T_E est simultanée et le rapport T_I/T_{TOT} n'est pas différent de celui des témoins. Aucune apnée inspiratoire, ni expiratoire n'a été observée lors de cette étude.

L'analyse de l'évolution relative des paramètres lors de la transition de la ventilation de repos à l'hypercapnie exogène (**Figure 37**) a révélé que seules les variations de T_E , T_{TOT} , V_T et conséquemment le rapport T_I/T_{TOT} étaient imputables à l'hypercapnie. Lors de la première heure, en situation d'hypercapnie, les rats ayant reçu du GHB expiraient plus lentement et mobilisaient à chaque respiration un volume plus important.

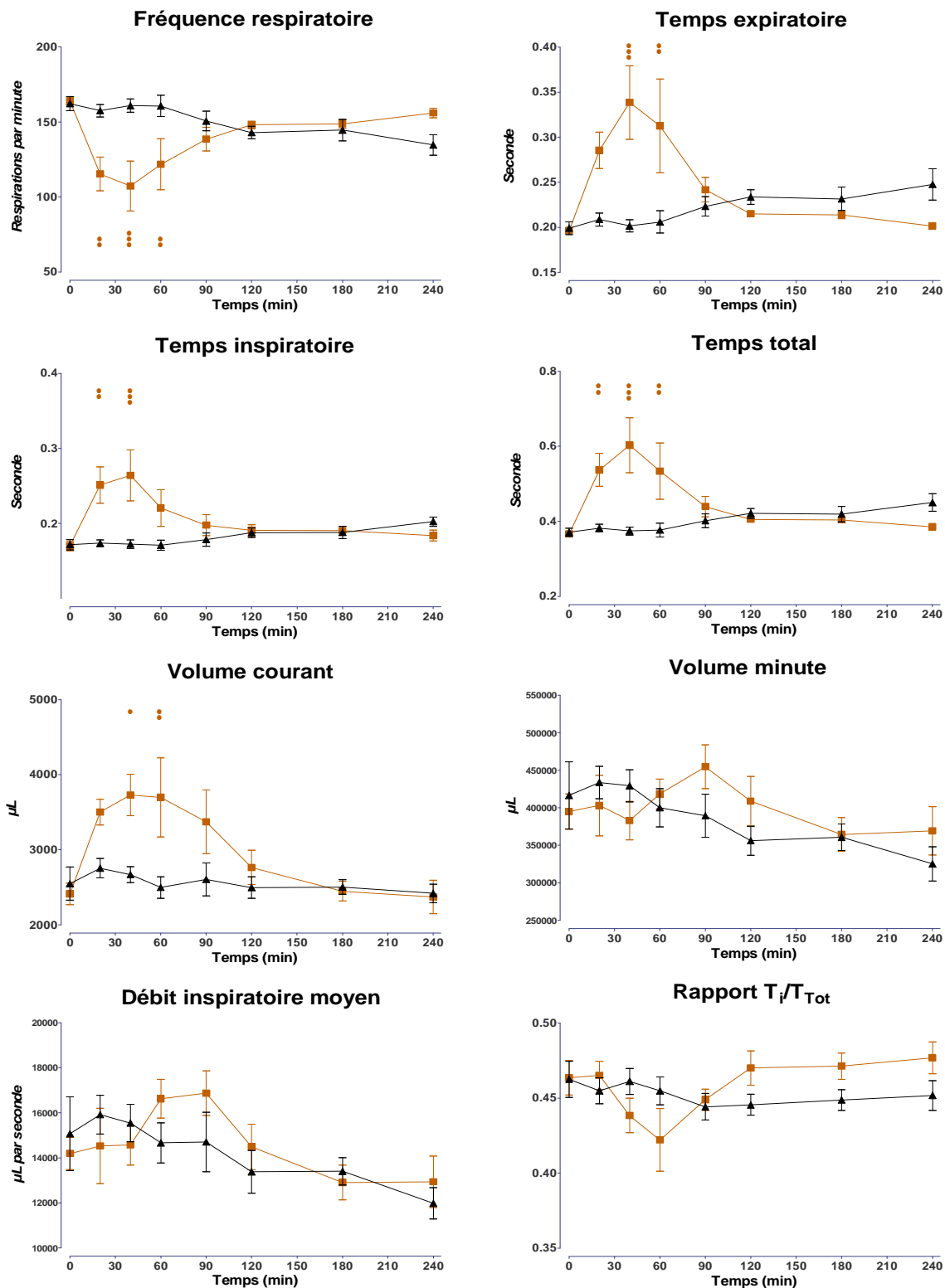


Figure 36 : Evolution des paramètres respiratoires en hypercapnie exogène au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB lors de l'épreuve d'hypercapnie exogène intermittente pour les groupes Témoins (bleu) et 300 mg.kg⁻¹ (marron).

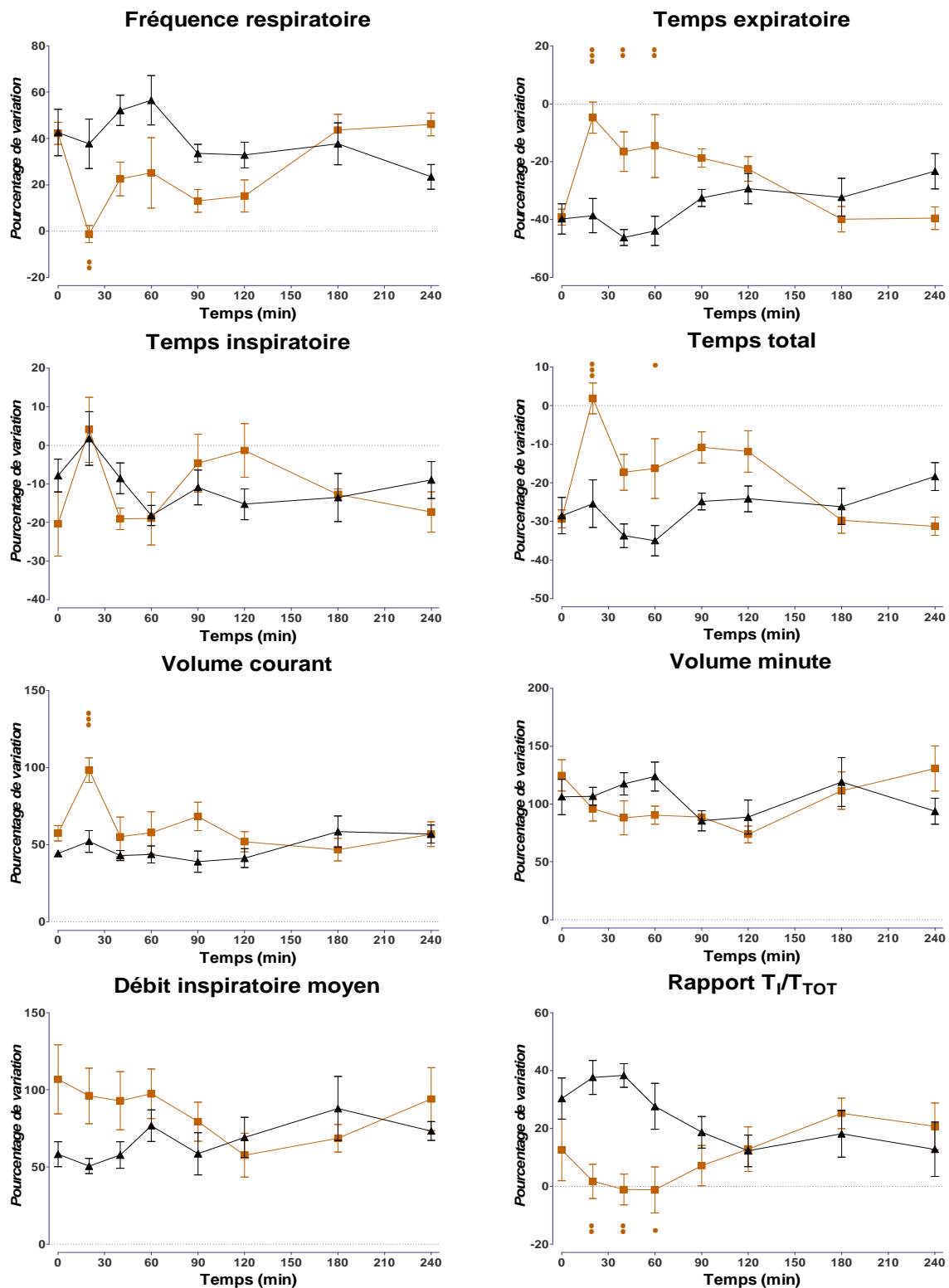


Figure 37 : Evolution relatives des paramètres respiratoires entre la ventilation de repos et l'hypercapnie exogène au cours des 240 minutes après l'administration IP de GHB lors de l'épreuve d'hypercapnie exogène intermittente pour les groupes Témoins (bleu) et 300 mg.kg⁻¹ (marron).

Chapitre 5 : études des effets respiratoires de l'association acide γ -hydroxybutyrique et l'éthanol

1 Paramètres respiratoires

L'étude des effets respiratoires de l'association du GHB et de l'éthanol est composée de deux sous-études : la première à la dose la plus importante de GHB n'ayant pas provoqué, lors de l'étude précédente, de respiration de type apneustique, soit 300 mg.kg^{-1} , la seconde à la dose la plus faible ayant provoqué une respiration de type apneustique, soit 600 mg.kg^{-1} .

1.1 Etude D1 : Paramètres respiratoires lors de la co-administration d'éthanol et d'une dose de GHB ne provoquant pas de respiration de type apneustique

Les animaux sont distribués entre 6 groupes ($n = 8$) : un groupe Témoin, un groupe GHB à 300 mg.kg^{-1} (G3), deux groupes Ethanol à 1 g.kg^{-1} (E1) et 3 g.kg^{-1} (E3) et deux groupes à 300 mg.kg^{-1} de GHB en association avec 1 g.kg^{-1} (G3E1) ou 3 g.kg^{-1} d'éthanol (G3E3).

Les études statistiques ont été menées avec l'ensemble des groupes. Par souci de clarté, les représentations graphiques ont été simplifiées en ne faisant apparaître que les groupes G3, G3E1 et G3E3.

1.1.1 Signes cliniques

Les animaux du groupe Témoin étaient asymptomatiques. Dans les groupes G3, E1 et E3, les rats ont présenté les mêmes signes cliniques que précédemment décrits.

Les G3E1 ont présenté un comportement similaire aux G3, à savoir, certains ont été asymptomatiques, d'autres (6/8) étaient comateux en moins de 20 min (entre 10 et 20 min). Ces derniers se sont tous brutalement réveillés avant 150 min (entre 90 et 150 min), soit un peu plus tardivement que pour les G3 (avant 120 min).

Les animaux du groupe G3E3 sont tous tombés dans le coma en moins de 30 min (entre 10 et 30 min), la majorité (6/8) en sont sortis lors de la dernière heure d'étude (entre 180 et 240 min). Durant cette période de sédation, certains d'entre eux (4/8) ont présenté des mouvements de mastication et des tentatives de redressement de la tête comme dans le groupe E3.

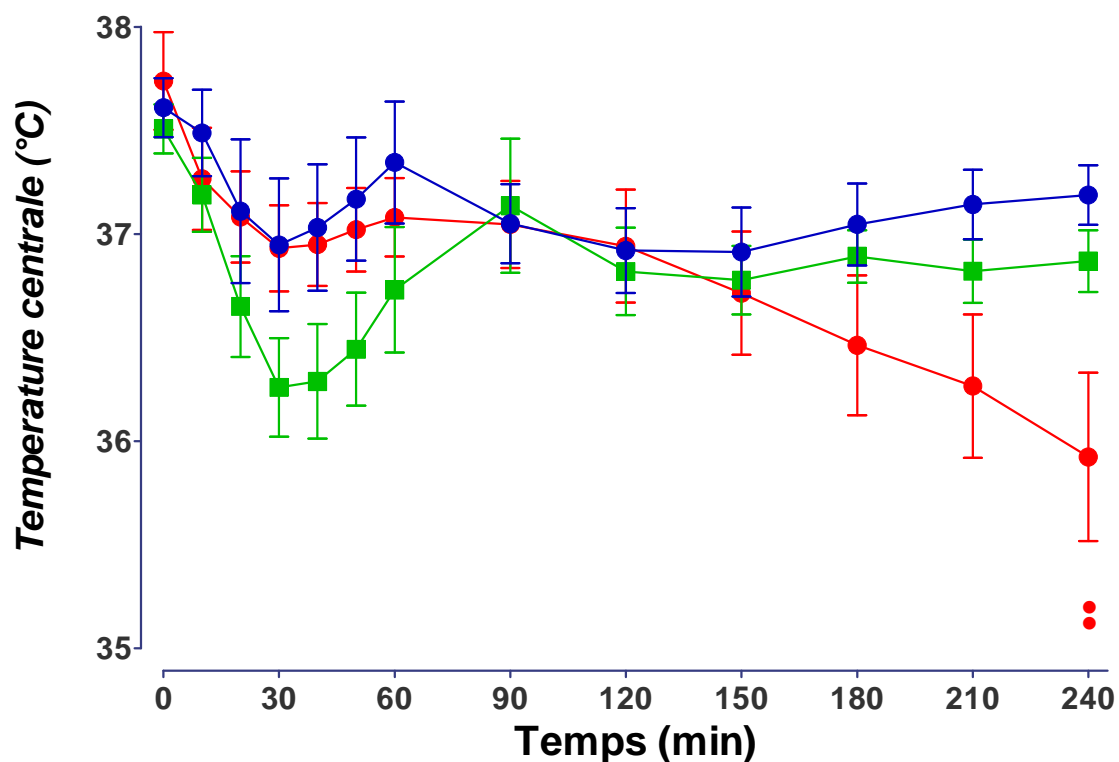


Figure 38 : Evolution de la température centrale au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G3 (bleu), G3E1 (vert) et G3E3 (rouge). Seules les significativités entre G3E1 et G3 (●) et entre G3E3 et G3 (●) ont été représentées.

L'évolution de température corporelle des groupes G3, E1 et E3 était la même que précédemment décrite.

Au cours des trois premières heures de l'expérimentation (**Figure 38**), l'éthanol n'a pas influé significativement sur l'évolution de température induite par le GHB à 300 mg.kg⁻¹, les groupes G3E1 et G3E3 n'ont pas montré de différence significative. Lors de la dernière heure, la température des animaux G3E3 a baissé, devenant significativement différente à 240 min.

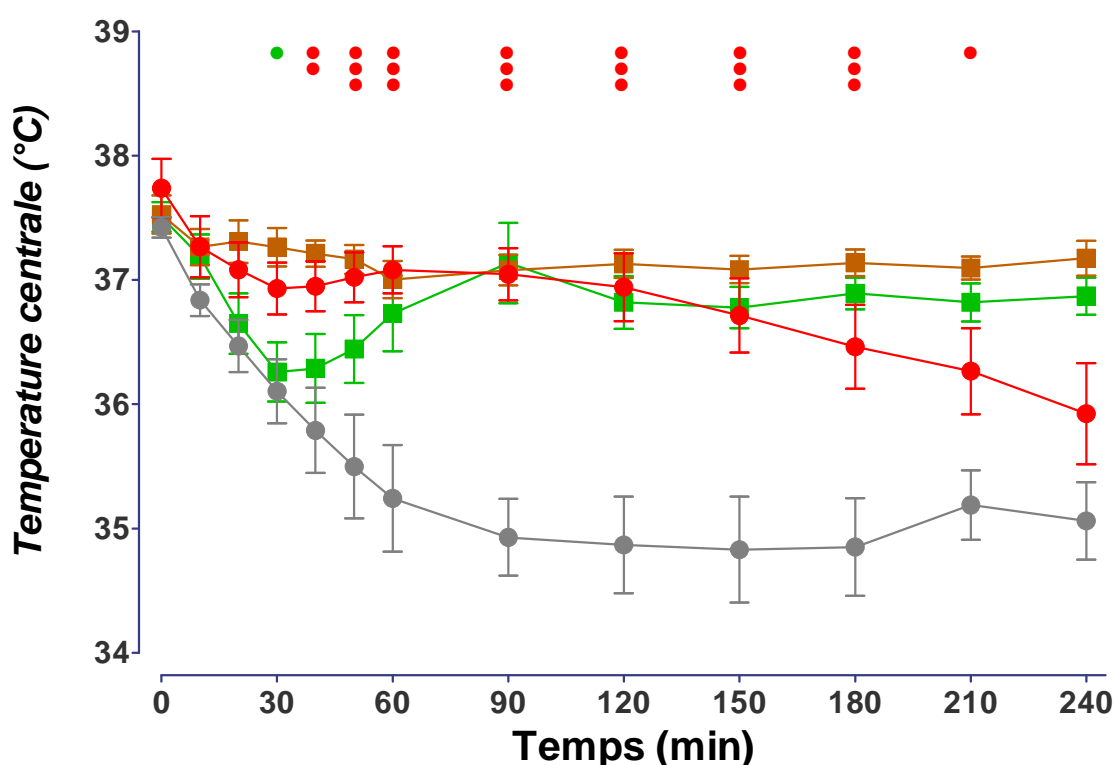


Figure 39 : Evolution de la température centrale au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G3E1 (vert), G3E3 (rouge), E1 (marron) et E3 (gris). Seules les significativités entre G3E1 et E1 (●) et entre G3E3 et E3 (●) ont été représentées.

Les effets de l'éthanol sur la température corporelle ont été modifiés en présence de GHB à 300 mg.kg⁻¹ (**Figure 39**). Ainsi, alors que la dose de 1 g.kg⁻¹ ne modifie pas la température du rat (E1), son association au GHB (G3E1) a provoqué une fugace hypothermie lors de la première heure, comparable à celle d'une même dose de GHB prise isolément. De même, en présence de GHB, l'éthanol à 3 g.kg⁻¹ (G3E3) n'a pas induit une hypothermie franche comme

celle produit par cette même dose d'alcool prise isolément (E3), par contre en fin d'expérimentation, l'hypothermie du groupe G3E3 n'est plus différente de celle de E3.

1.1.2 Paramètres respiratoires

Les groupes G3, E1 et E3 ont présenté les mêmes évolutions des paramètres respiratoires que lors des précédentes études. Ainsi, les animaux de G3 ont eu tendance à respirer plus lentement, avec augmentation significative du T_I entre 20 et 50 min ($p < 0,01$ à $p < 0,001$ par rapport au groupe Témoin). Les rats du groupe E1 n'ont présence aucune différence avec ceux du groupe Témoin et ceux du groupe E3 ont respiré plus rapidement que les rats témoins, augmentation de f entre 10 et 40 min ($p < 0,05$ à $p < 0,01$ par rapport au groupe témoin).

Les groupes d'association du GHB à l'éthanol ne montrent pas de différence significative avec le groupe GHB à l'exception du T_I à 120 min pour G3E3. Bien que non significative, l'augmentation du T_I semble retardée et cet effet semble se prolonger. Cette tendance non significative se dessine aussi dans l'évolution au cours de l'étude du rapport T_I/T_{TOT} de G3E3 (*Figure 40a et Figure 40b*). L'association de l'éthanol au GHB n'a pas déclenché de respiration de type apneustique.

En comparant les groupes G3E1 et G3E3 respectivement aux groupes Ethanol E1 et E3, les variations significatives sont comparables à celles observées contre les témoins, ralentissement de la respiration avec baisse significative du temps inspiratoire :

- de 20 à 60 min pour G3E1 ($p < 0,001$ contre E1) ;
- de 20 à 120 min pour G3E3 ($p < 0,05$ à $p < 0,01$ contre E3).

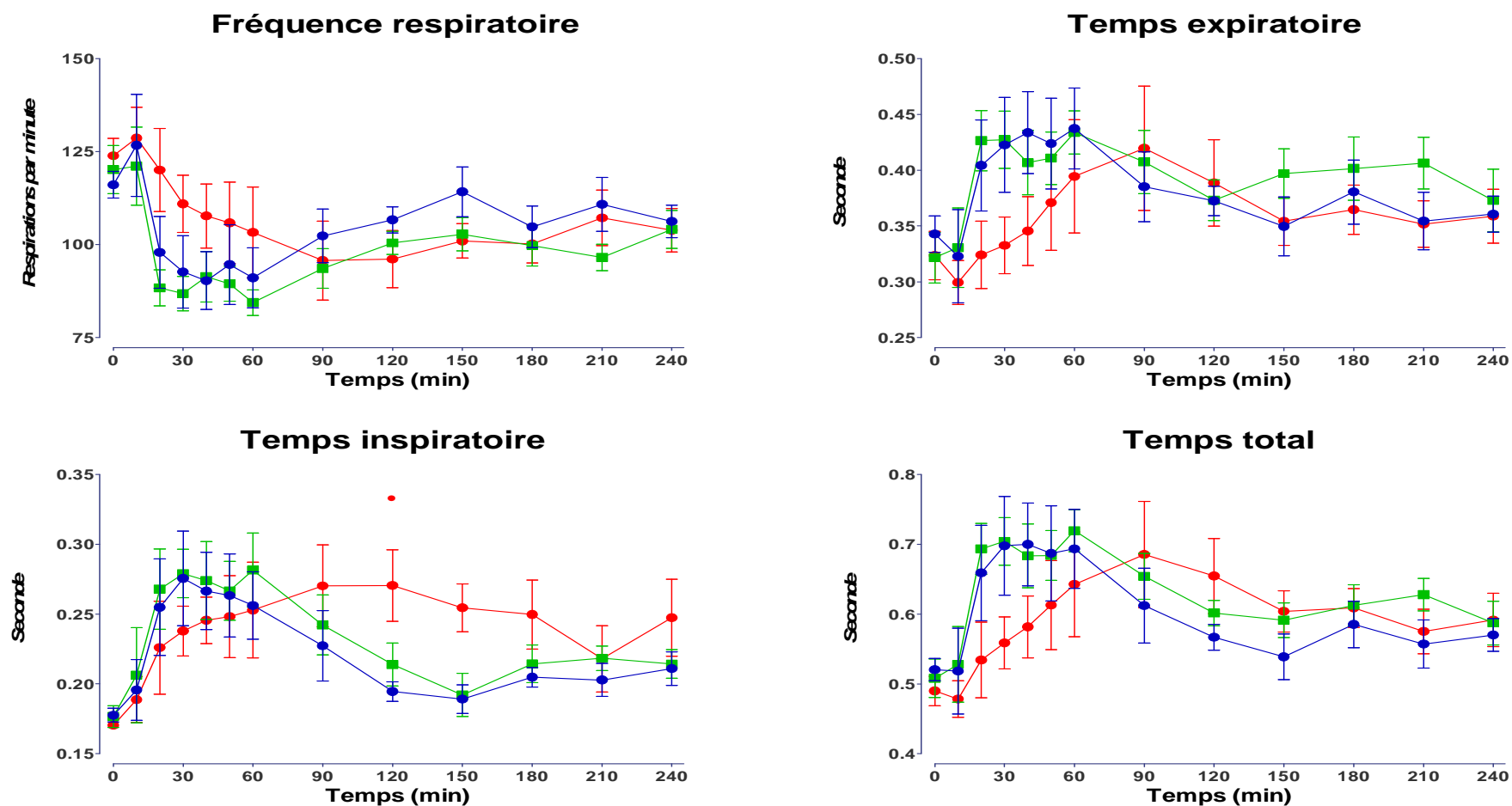


Figure 40a : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G3 (bleu), G3E1 (vert) et G3E3 (rouge). Seules les significativités entre G3E1 et G3 (●) et entre G3E3 et G3 (●) ont été représentées.

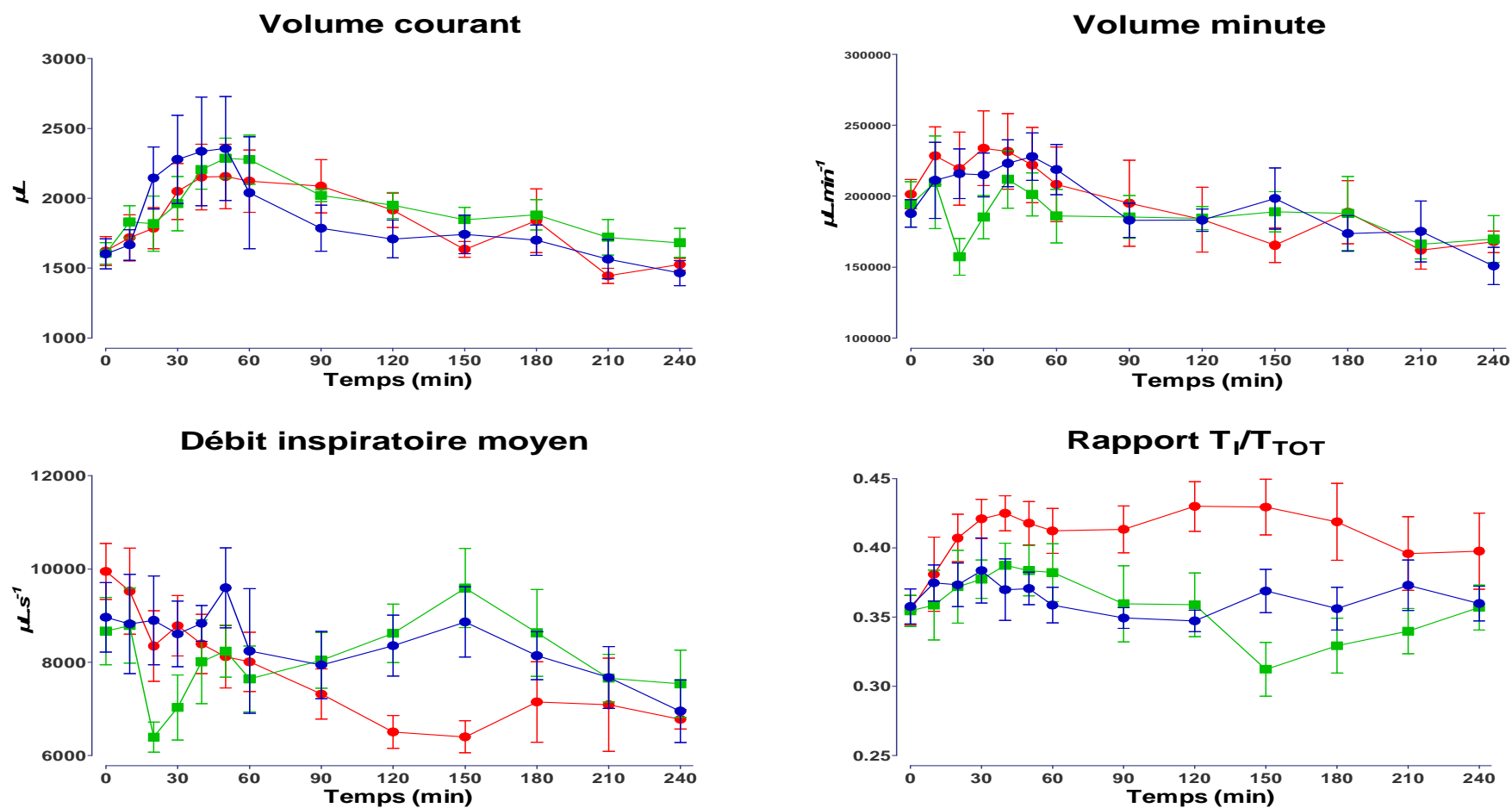


Figure 40b : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G3 (bleu), G3E1 (vert) et G3E3 (rouge).

1.2 Etude D2 : Paramètres respiratoires lors de la co-administration d'éthanol et d'une dose de GHB provoquant par elle-même une respiration de type apneustique

Les animaux sont distribués entre 6 groupes ($n = 8$) : un groupe Témoin, un groupe GHB à 600 mg.kg^{-1} (G6), deux groupes Ethanol à 1 g.kg^{-1} (E1) et 3 g.kg^{-1} (E3) et deux groupes à 600 mg.kg^{-1} de GHB en association avec 1 g.kg^{-1} (G6E1) ou 3 g.kg^{-1} d'éthanol (G6E3).

Comme pour l'étude précédente, les études statistiques ont été menées avec l'ensemble des groupes mais les représentations graphiques ont été simplifiées, seuls les groupes G6, G6E1 et G6E3 y sont représentés.

1.2.1 Signes cliniques

Les animaux du groupe Témoin étaient asymptomatiques. Dans les groupes G6, E1 et E3, les rats ont présenté les mêmes signes cliniques que précédemment décrits.

Les G6E1 sont tombés en moins de 20 minutes (de 0 à 20 minutes) dans le coma. Un individu n'en était pas sorti au bout de 240 min mais les autres (7/8) se sont tous brutalement réveillés entre 120 et 240 min.

Les animaux du groupe G6E3 sont tous tombés dans le coma en moins de 20 min (entre 0 et 20 min), au terme du délai d'expérimentation, 240 min, aucun n'en était sorti. Chez un seul animal (1/8), des mouvements ont été enregistrés.

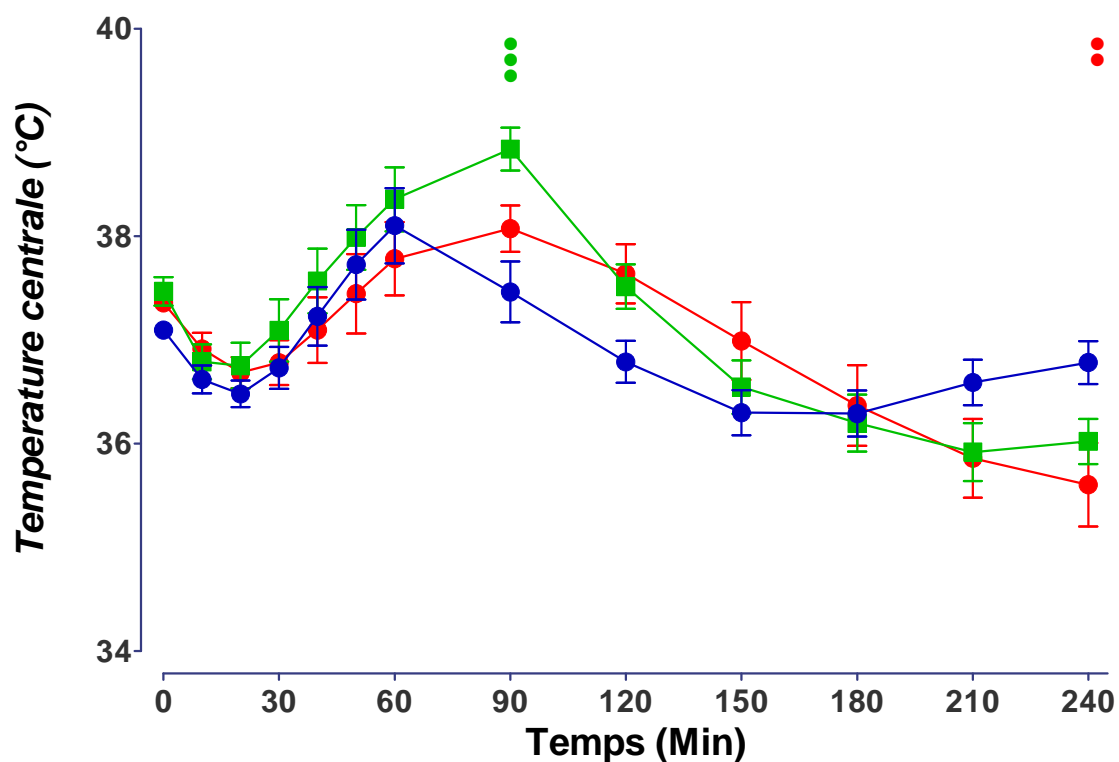


Figure 41 : Evolution de la température centrale au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G6 (bleu), G6E1 (vert) et G6E3 (rouge). Seules significativités entre G6E1 et G6 (●) et entre G6E3 et G6 (●) ont été représentées.

L'évolution de température corporelle des groupes G6, E1 et E3 était la même que précédemment décrite.

Les groupes G6, G6E1 et G6E3 ont présenté une évolution triphasique de la température corporelle, soit : hypothermie – hyperthermie – hypothermie (**Figure 41**). En présence d'éthanol, les deux différences significatives isolées peuvent souligner une tendance à la majoration de l'hyperthermie pour G6E1 et de l'hypothermie terminale G6E3.

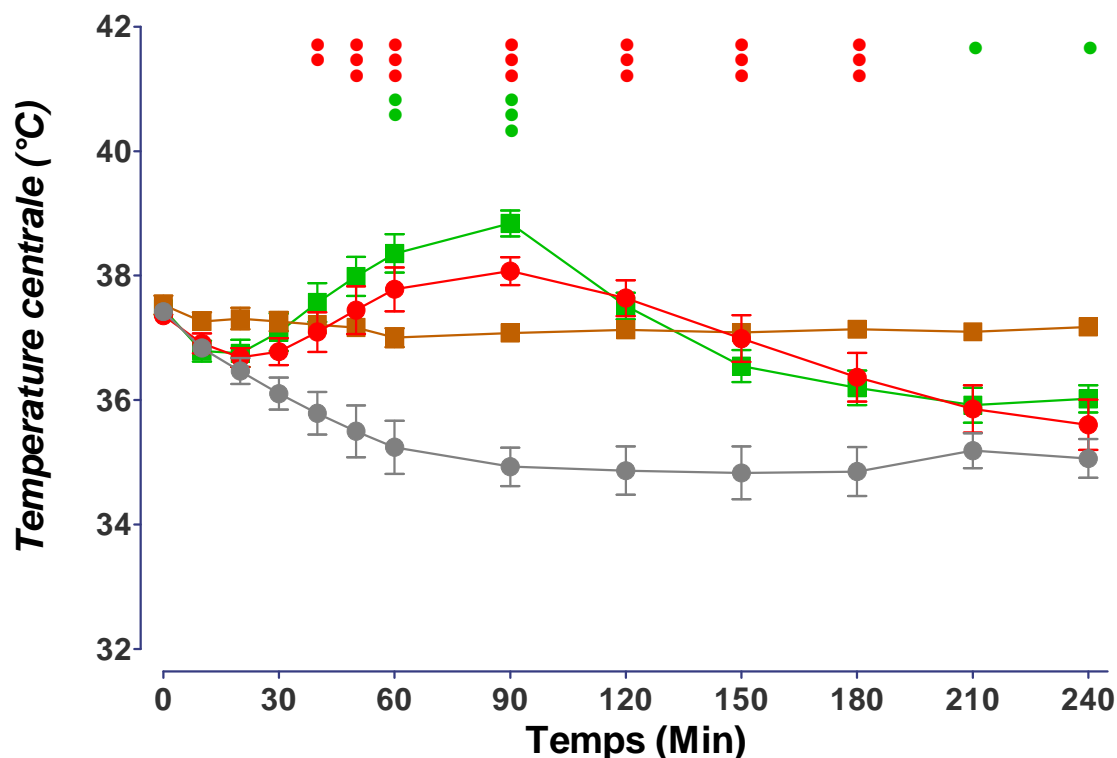


Figure 42 : Evolution de la température centrale au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G6E1 (vert), G6E3 (rouge), E1 (marron) et E3 (gris). Seules les significativités entre G6E1 et E1 (●) et entre G6E3 et E3 (●) ont été représentées.

L'association du GHB 600 mg.kg⁻¹ à l'éthanol a provoqué, lors des quatre heures suivant l'administration, des variations de température corporelle significativement différentes de celles provoquées par les mêmes doses d'éthanol prises isolément.

- Le groupe E1 présentant un profil de température identique aux témoins, l'évolution triphasique de la température des G6E1 se distingue de celle des E1 comme des Témoins : dans sa phase hyperthermique, de 60 à 90 min ($p < 0,01$ à $p < 0,001$), puis dans sa phase hypothermique finale, de 210 à 240 min ($p < 0,05$).
- De 40 à 180 min, en place de l'hypothermie franche provoquée par 3 g.kg⁻¹ d'éthanol, le groupe G6E3 a montré une hyperthermie relative bien distincte ($p < 0,001$) suivie, après 180 min, d'une hypothermie qui se confond avec celles des E3.

1.2.2 Paramètres respiratoires

L'association de l'éthanol au GHB à 600 mg.kg^{-1} a provoqué le même type d'effets respiratoires que le GHB seul, baisse de f et augmentation de V_T , mais avec augmentation de leur intensité et retard dans leur apparition (*Figure 43a et Figure 43b*).

Ainsi, le groupe G6E1 présentait un retard significatif dans l'augmentation de T_I à 20, 30 et 120 min ($p < 0,05$ à $p < 0,001$) et dans celle de V_T à 90 min ($p < 0,05$). Pour les paramètres f et T_E , des tendances non significatives à ce phénomène étaient perceptibles.

Le groupe G6E3 a présenté des différences significatives avec G6 pour tous les paramètres respiratoires. La diminution de f a été retardée lors des 40 premières minutes ($p < 0,01$). Après 60 min, alors que chez les rats du groupe G6, f augmentait et se normalisait progressivement, pour les G6E3, f continuait à décroître jusqu'à T_{150} . De 150 à 240 min, bien qu'en phase de croissance, la différence est restée significative ($p < 0,001$). Ce retard et cette intensification des effets, ont été aussi observées de façon significative pour T_I , V_T et T_E .

Les animaux de G6E3 n'ayant pas pu mobiliser un volume d'air adapté à leur fréquence respiratoire, ils n'ont pas pu maintenir V_E à partir de 150 min ($p < 0,05$ à $p < 0,001$). De même, puisque T_I restait élevé alors que V_T décroissait, le débit inspiratoire moyen a chuté après 150 min ($p < 0,05$ à $p < 0,05$).

Lors de la comparaison des groupes G6E1 et G6E3 respectivement aux groupes E1 et E3, les mêmes effets sont mis en évidence : ralentissement de la respiration avec augmentation de T_I et T_E et augmentation du V_T . L'augmentation de la significativité des différences par rapport au groupe Témoin ou G6, est principalement liée à la tendance des rats alcoolisés à respirer plus rapidement que le rats témoins.

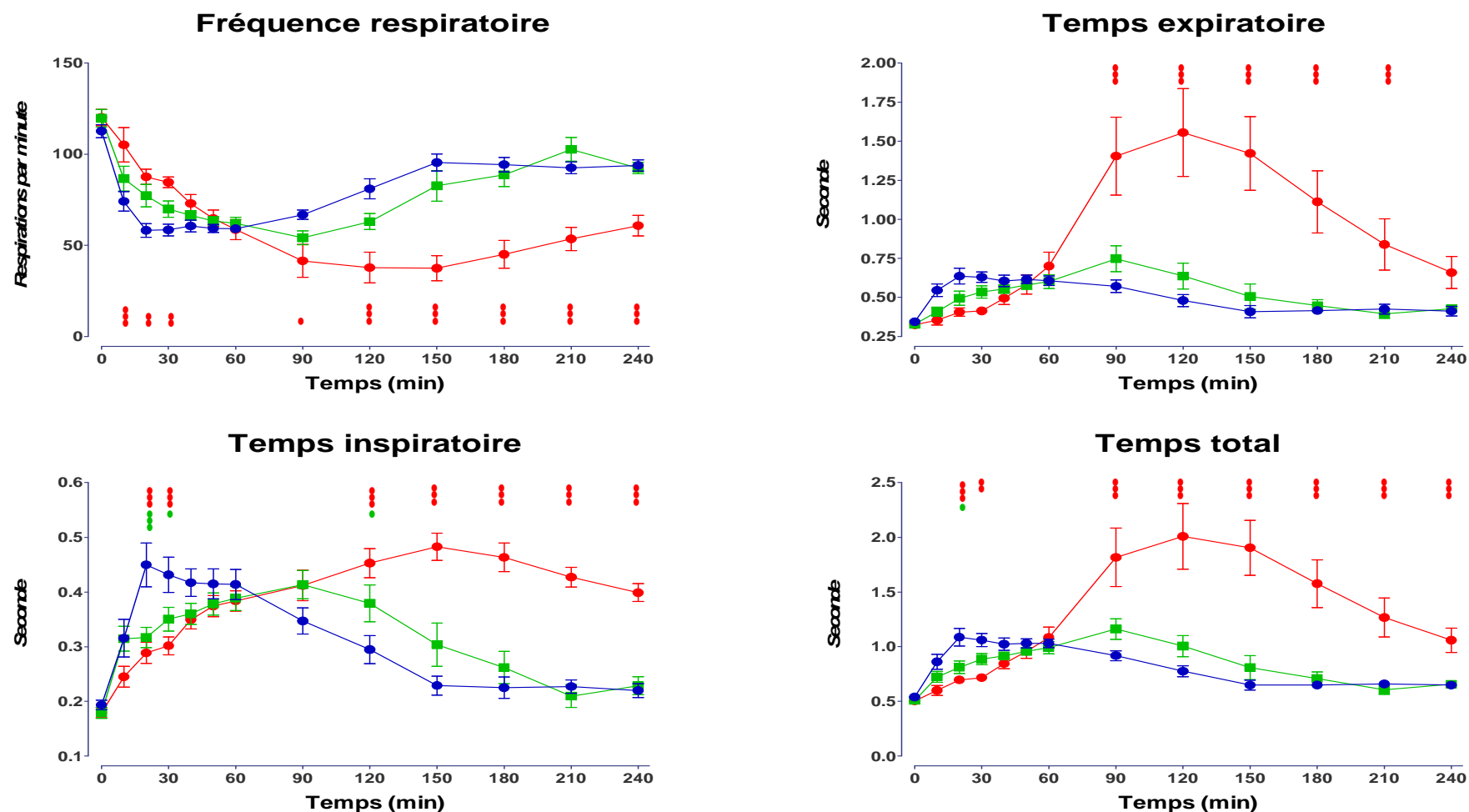


Figure 43a : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G6 (bleu), G6E1 (vert) et G6E3 (rouge). Seules les significativités entre G6E1 et G6 (●) et entre G6E3 et G6 (●) ont été représentées.

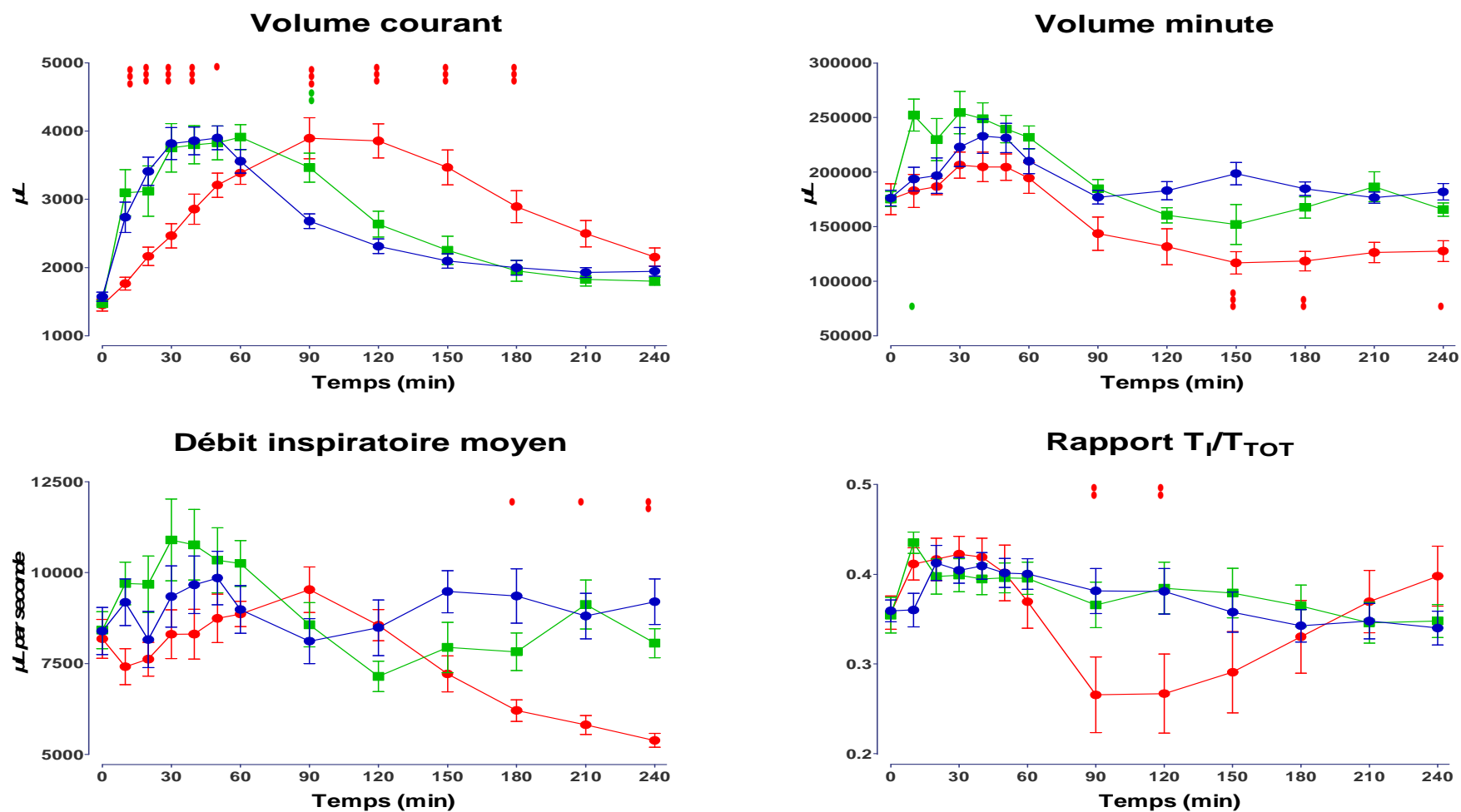


Figure 43b : Evolution des paramètres respiratoires au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G6 (bleu), G6E1 (vert) et G6E3 (rouge). Seules les significativités entre G6E1 et G6 (●) et entre G6E3 et G6 (●) ont été représentées.

Enfin, l'augmentation importante de T_E après 60 min, jusqu'à plus de 4 fois sa valeur basale, sans augmentation proportionnelle de V_T , et la réduction significative du rapport T_I/T_{TOT} entre 90 et 150 min alors que T_I présentait ses maxima, signent l'apparition d'apnées expiratoires conséquentes.

Les animaux des groupes G6, G6E1 et G6E3 ayant présenté une respiration de type apneustique, dans une seconde étape, les signaux ont été traités de manière à séparer les phases inspiratoires et expiratoires des phases apnéiques, comme précédemment décrit.

En **Figure 44**, les graphiques ont été établis à des échelles équivalentes afin d'apprécier l'ampleur des phénomènes apnéiques. La composante apnéique de la phase d'inspiration est restée minoritaire (T_{IC} maximal : 0,35s ; A_I maximale : 0,09s) alors que l'inverse s'est produit lors de l'expiration (T_{EC} maximal : 0,45s ; A_E maximale : 1,15s).

Le retard provoqué par l'éthanol à 3 g.kg⁻¹ sur l'augmentation de T_I et de T_E est aussi significatif sur les temps corrigés, T_{IC} et T_{EC} , de 10 à 30 min ($p < 0,05$ à $p < 0,001$).

- Pour T_{IC} , les maxima des trois groupes ne se différencient pas, alors que pour G6E3 l'aire sous la courbe significativement plus importante et l'augmentation significative du T_{IC} entre 90 et 240 min confirment une augmentation de la durée de l'effet sur le T_I .
- Pour T_{EC} , le maximum de G6E3 est significativement plus petit que celui de G6, mais les T_{max} apparents sont différents : 30 min pour G6 et G6E1 contre 90 min pour G6E3. Au temps d'apparition du maximum de T_{EC} du groupe G6E3, celui-ci n'est pas

significativement différent des T_{EC} des autres groupes. Les aires sous la courbe des T_{EC} ne se distinguent pas pour les trois groupes (*Figure 45*).

Pour les apnées, le retard dans l'effet n'est jamais significatif au cours de la première heure. Par contre, dès 90 min, les A_I et A_E de G6E3 deviennent significativement différentes de celles de G6 jusqu'à 210 min. Conséquemment à cette différence, l'aire sous la courbe de A_I et A_E pour le groupe G6E3 est significativement plus grande que de celles de G6 et G6E1. Enfin, seul le maximum d' A_E de G6E3 est significativement supérieur à celui des deux autres groupes, les maxima des A_I ne se distinguent par entre les groupes (*Figure 46*).

Les apnées inspiratoires et expiratoires sont apparues simultanément, entre 90 et 210 min.

- Les A_I sont contemporaines des maxima des T_{IC} du groupe G6E3 alors significativement différents des T_{IC} des autres groupes.
- Les A_E apparaissent lors des maxima des T_{EC} du groupe G6E3 mais ceux-ci ne sont pas significativement différents de ceux des autres groupes.

Enfin, les T_E et A_E du groupe G6E3 sont comparés à ceux des groupes GHB 600 (G6), 1000 et 1600 mg.kg⁻¹ obtenus lors de l'étude des effets du GHB administré isolément (*Tableau 20*). G6E3 présente des T_E et A_E maximaux significativement supérieurs à ceux du groupe G6 et non significativement supérieurs à ceux du groupe GHB 1000 mg.kg⁻¹.

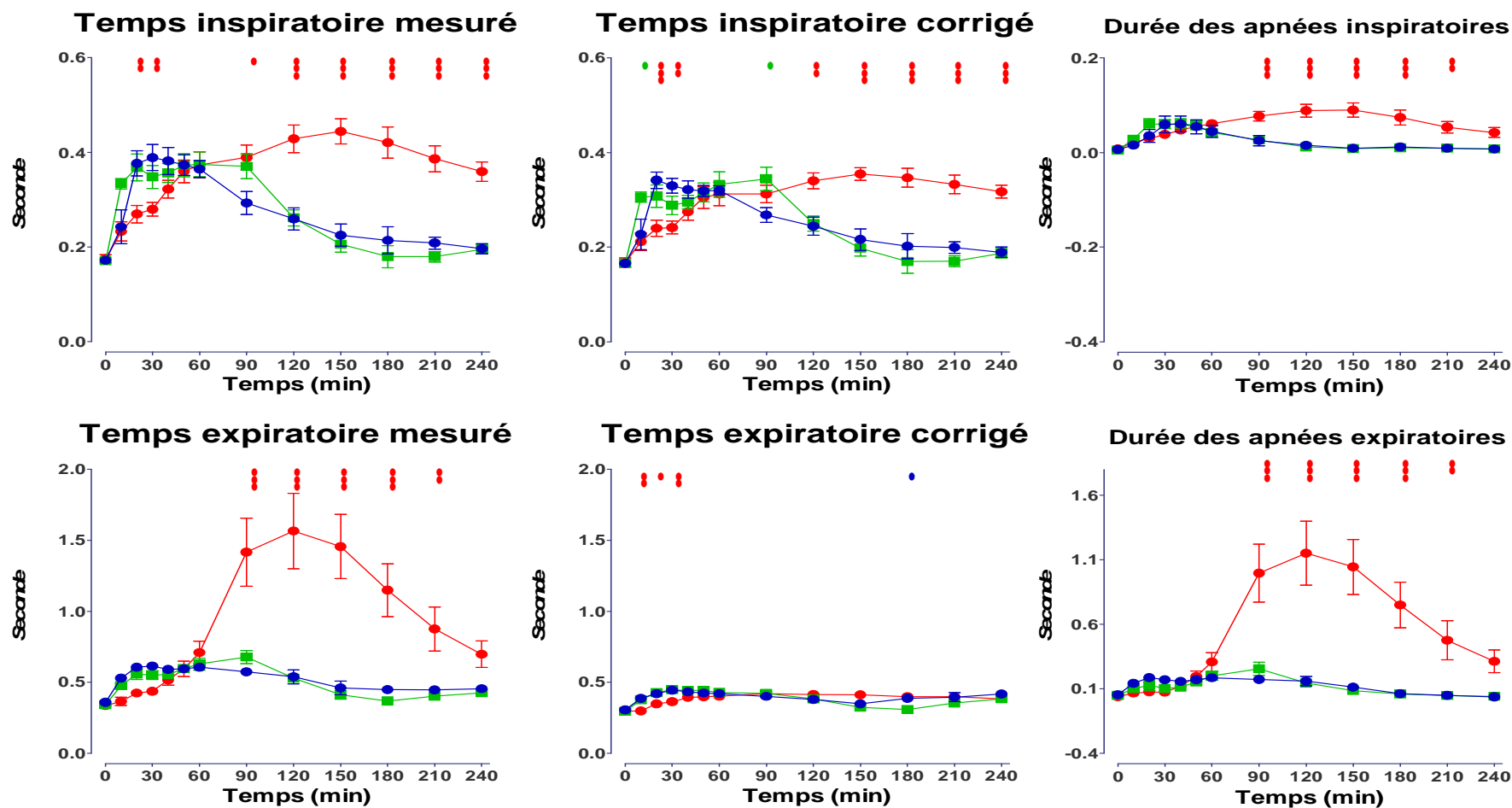


Figure 44 : Evolution des temps mesurés et corrigés, et des durées des apnées, inspiratoires et expiratoires, au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G6 (bleu), G6E1 (vert) et G6E3 (rouge). Seules les significativités entre G6E1 et G6 (●) et entre G6E3 et G6 (●) ont été représentées.

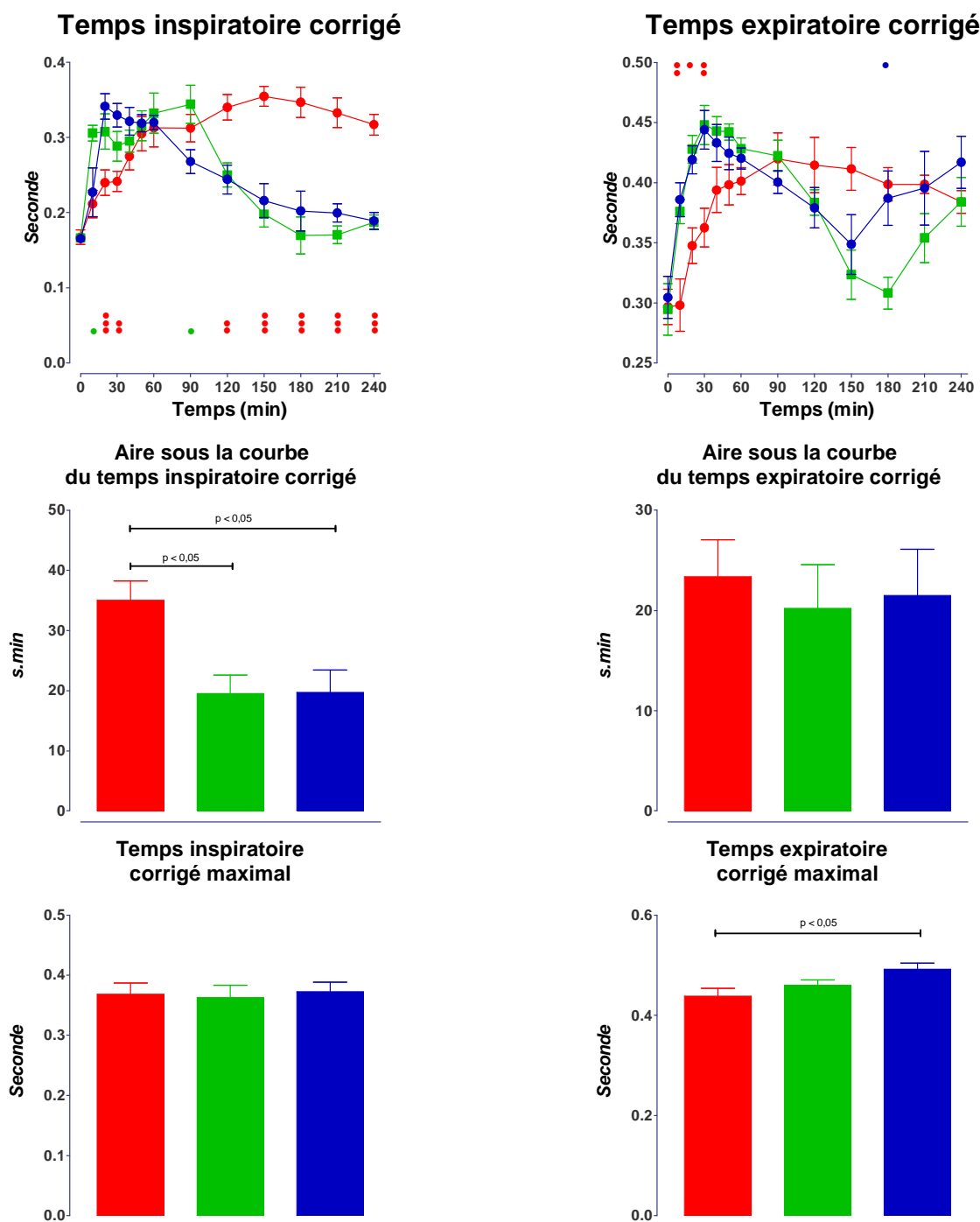


Figure 45 : [haut] Evolution des T_{IC} et T_{EC} au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G6 (bleu), G6E1 (vert) et G6E3 (rouge). Seules les significativités entre G6E1 et G6 (●) et entre G6E3 et G6 (●) ont été représentées. – [milieu] Comparaison des aires sous la courbe des T_{IC} et T_{EC} en fonction des groupes – [bas] Comparaison des maxima des T_{IC} et T_{EC} en fonction des groupes.

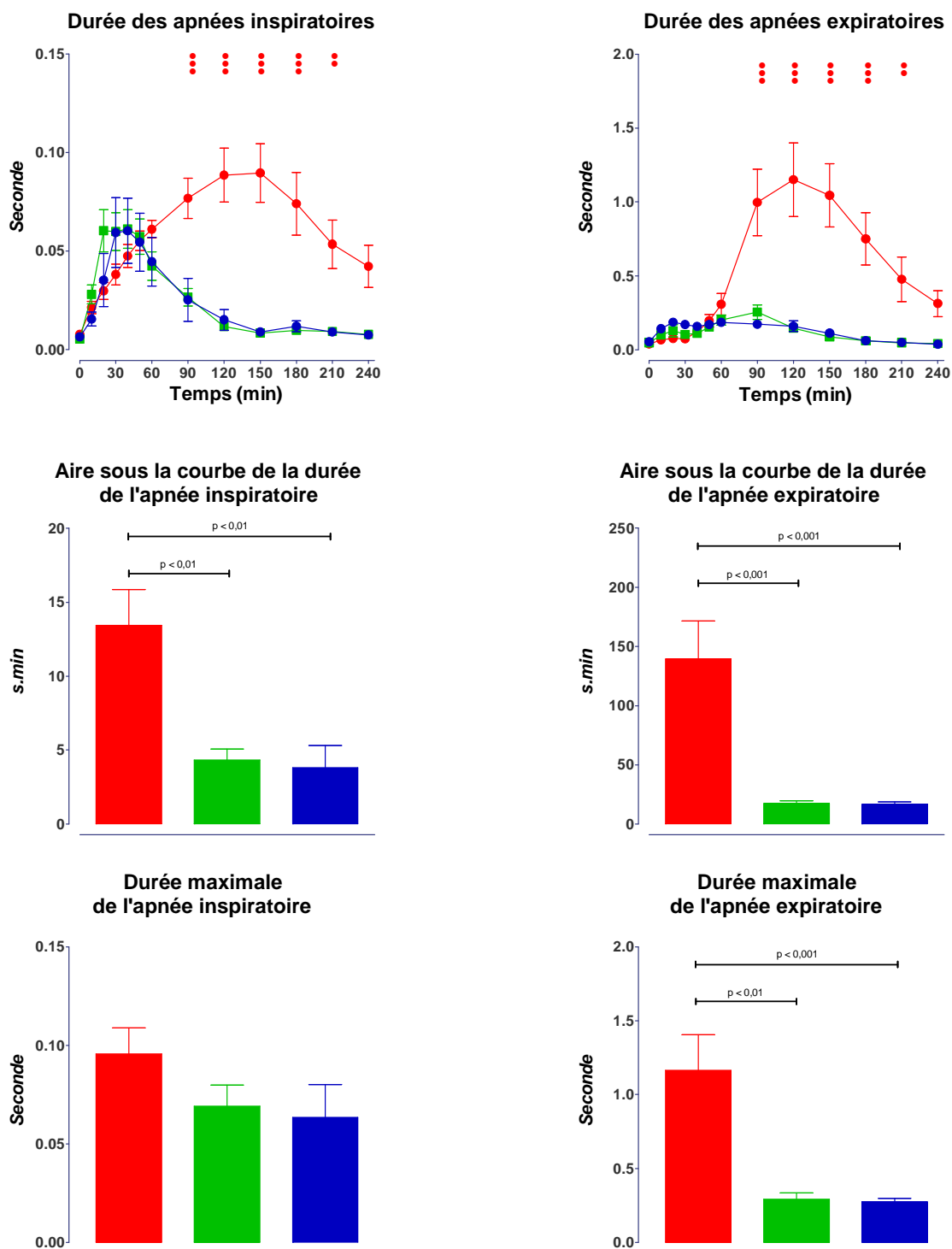


Figure 46 : [haut] Evolution des A_I et A_E au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : G6 (bleu), G6E1 (vert) et G6E3 (rouge). Seules les significativités entre G6E1 et G6 (●) et entre G6E3 et G6 (●) ont été représentées. – [milieu] Comparaison des aires sous la courbe des A_I et A_E en fonction des groupes – [bas] Comparaison des maxima des A_I et A_E en fonction des groupes.

Tableau 20 : Comparaison des T_E et A_E du groupe G6E3 avec les groupes GHB 600, 1000 et 1600 mg.kg⁻¹

Groupe	GHB 600 mg.kg ⁻¹ + Ethanol 3g.kg ⁻¹ (G6E3)	GHB 1600 mg.kg ⁻¹	GHB 1000 mg.kg ⁻¹	GHB 600 mg.kg ⁻¹ (G6)
T_E maximal en s	1,57 ± 0,27	1,45 ± 0,20	1,04 ± 0,10	0,70 ± 0,03 ^a
A_E maximale en s	1,16 ± 0,24	1,03 ± 0,17	0,64 ± 0,08	0,27 ± 0,02 ^a

^a test t, $p < 0,01$ par rapport aux valeurs du groupe G6E3

2 Etude D3 : Cinétiques sanguines veineuses du GHB et de l'éthanol après leur administration simultanée

Les animaux ont été distribués entre 4 groupes (n=4) : un groupe Témoin, un groupe GHB 600 mg.kg⁻¹ (G6), un groupe éthanol 3 g.kg⁻¹ (E3) et un groupe recevant l'association GHB 600 mg.kg⁻¹ et éthanol 3 g.kg⁻¹ (G6E3).

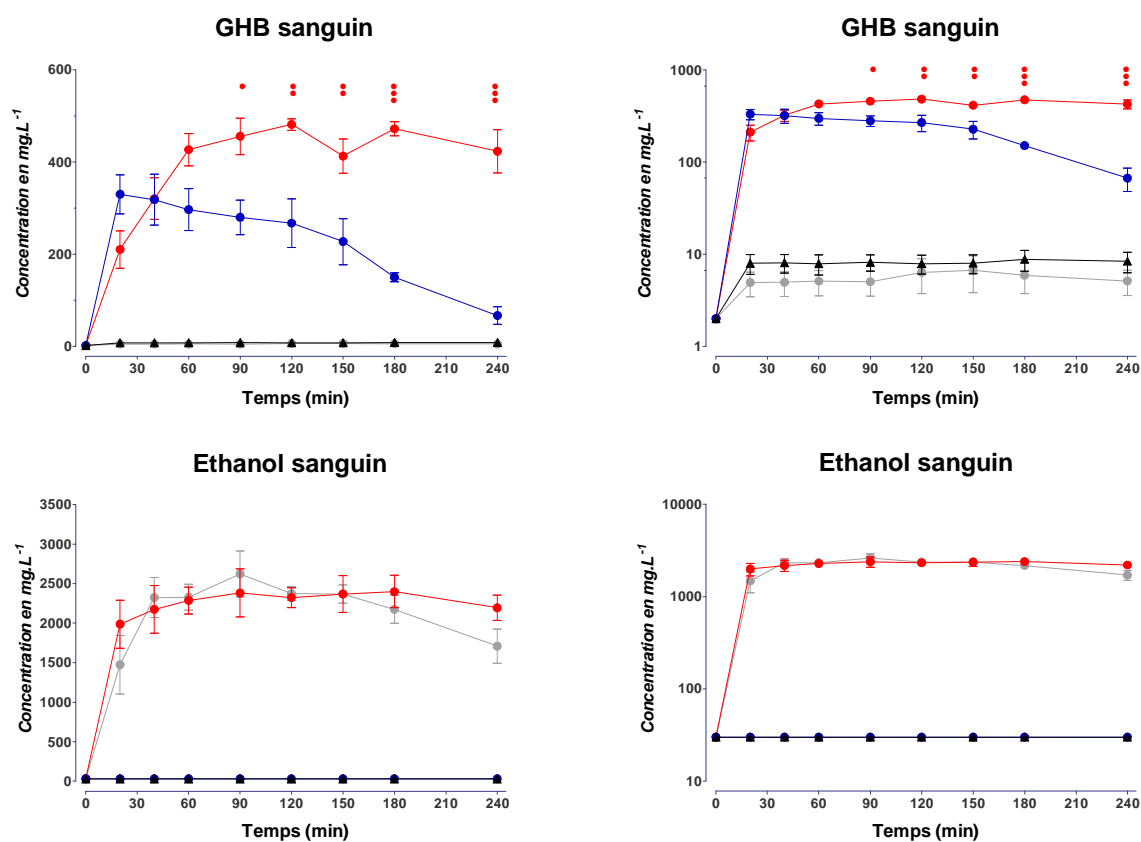


Figure 47 : Cinétique veineuse du GHB (en haut, à droite : échelle semi-logarithmique, à gauche : échelle linéaire) et de l'éthanol (en bas, à droite : échelle semi-logarithmique, à gauche : échelle linéaire) au cours des 240 minutes après l'administration IP des substances pour les groupes : Témoin (noir), G6 (bleu), E3 (gris) et G6E3 (rouge). Seules les significativités entre G6E3 et G6 (●) ont été représentées.

Tableau 21 : Paramètres cinétiques veineux apparents du GHB et de l'éthanol pour les groupes G6, E3 et G6E3

Cinétique sanguine veineuse du GHB			Cinétique sanguine veineuse de l'éthanol		
Paramètre ⁽³⁾	Groupe		Paramètre	Groupe	
	G6	G6E3		E3	G6E3
AUC _{0→240} (g.L ⁻¹ .min)	53,4±11,7	95,8±11,1 ^a	AUC _{0→240} (g.L ⁻¹ .min)	504±70	527±92
Cmax (mg.L ⁻¹)	368±68	510±38 ^b	Cmax (mg.L ⁻¹)	2830±489	2581±343
Tmax ⁽⁴⁾ (min)	30 [20-60]	135 [90-240] ^b	Tmax (min)	90 [40-120]	90 [40-150]

^a test t, p < 0,01 par rapport aux valeurs du groupe G6

^b test t, p < 0,05 par rapport aux valeurs du groupe G6

⁽³⁾ Les paramètres sont exprimés comme la moyenne ± SD.⁽⁴⁾ Le Tmax reporté est la valeur médiane des Tmax observés [Intervalle des observations]

L'éthanol est resté indécélable dans le sang des témoins et des individus du groupe G6. Les groupes E3 et G6E3 ont présenté des éthanolémies supérieures à 2000 mg.L^{-1} mais ces deux cinétiques ne diffèrent pas (*Figure 47 & Tableau 21*).

Le GHB a été détecté dans tous les échantillons mais seuls les animaux des groupes G6 et G6E3 présentaient des concentrations supérieures à 10 mg.L^{-1} . Les cinétiques au sein de ces deux derniers groupes diffèrent. G6E3 se distingue avec un ralentissement de l'absorption du GHB (T_{max} à 135 min *versus* 30 min pour G6, test $p < 0,05$), une augmentation de la concentration maximale mesurée (510 mg.L^{-1} *versus* 368 mg.L^{-1} pour G6, test $p < 0,05$), une réduction de l'élimination et une augmentation de l'aire sous la courbe ($95,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}$ *versus* $53,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}$, t test $p < 0,01$).

Chapitre 6 : Discussion

En préambule à la discussion des résultats observés, nous revenons sur les choix qui ont dû être effectués *a priori*.

~ ~ O ~ ~

Il a été décidé dans cette première approche de se concentrer sur les effets des substances actives *princeps* correspondant aux usages récréatifs envisagés. Or, si le GHB est accessible dans des formes d'assez grande pureté et que le THC peut être retrouvé de nos jours sous certaines formes pharmaceutiques, l'essentiel de l'exposition à l'éthanol et au THC provient de la consommation de mélanges (boissons alcoolisées ; débris végétaux de *Cannabis* et leurs produits dérivés : résines et huiles). L'exposition au GHB peut, quant à elle, avoir comme origine la consommation de GBL ou de 1,4-BD (Schep et coll., 2012).

Les mélanges consommés ont des compositions multiples et variables. Le panel de boissons alcoolisées commercialisées, la variété des coquetels et les différences de composition des résines de *Cannabis* en témoignent. Ainsi, d'autres substances actives présentes peuvent interagir soit directement, soit indirectement en modulant les effets des principes actifs. La modulation des effets du THC a d'ailleurs déjà été rapportée pour certains autres cannabinoïdes naturels (Hayakawa et coll., 2008, DeLong et coll., 2010, Karschner et coll., 2011, Klein et coll., 2011). Toutes les situations ne pouvaient être envisagées, et dans cette première approche, notre choix s'est porté sur les substances pures, leurs propriétés ne différant pas de celles des produits accessibles (Varvel et coll., 2005).

La consommation de GBL et de 1,4-BD aboutit, après métabolisation, au GHB qui est à l'origine des effets observés. Ainsi, conscients que cette étape préliminaire module la biodisponibilité du GHB, nous avons choisi de restreindre l'étude aux effets après

administration de GHB. La confirmation des effets observés après administration de GBL ou de 1,4-BD pourrait faire l'objet d'une étude ultérieure.

~ ~ o ~ ~

Notre modèle a été conditionné par plusieurs limites soit techniques, soit liées aux substances.

Pour les mesures en pléthysmographie corps entier, nous devons standardiser les protocoles et l'administration des substances afin de garantir la comparabilité des groupes. Nous avons été contraints d'appliquer les exigences maximales pour tous les groupes. L'administration IP a été choisie bien que, lors d'un usage récréatif, la voie principale d'administration est la voie pulmonaire pour le THC et la voie digestive pour l'éthanol et le GHB.

L'administration du THC par voie pulmonaire après nébulisation ou fumigation est possible, mais il n'y a alors aucune maîtrise de la dose absorbée et l'aérosol peut avoir une action directe sur les voies respiratoires.

L'administration par voie orale impose, quant à elle, l'emploi d'une sonde de gavage. Celle-ci peut provoquer chez l'animal une gêne à la respiration et un stress supplémentaire, et ainsi perturber les mesures précoces en pléthysmographie corps entier. De plus, lors d'une administration orale, le jeûne est généralement imposé car la biodisponibilité de l'éthanol est très peu reproductible avec des animaux alimentés (Pohorecky and Brick, 1988) et les cinétiques diffèrent (Payne et coll., 1966, Strubelt et coll., 1974, Roine et coll., 1991). Cependant, nous n'avons pas voulu priver les animaux de nourriture en raison (1) de la crédibilité de la situation et (2) de la diminution du métabolisme de l'éthanol observée lors d'un jeûne (Smith and Newman, 1959). Ainsi, éviter la voie digestive, le premier passage métabolique stomacal (Lim et coll., 1993) et le jeûne par l'administration IP des substances

devait permettre une absorption plus reproductible et conséquemment des cinétiques moins variables et plus propices à l'observation d'effets significatifs. La biodisponibilité IP de l'éthanol étant supérieure à celle de la voie orale (Gilliam et coll., 1985, Ogilvie et coll., 1997), les doses nécessaires à l'observation d'un effet devraient être moindres par voie IP. A distance des voies aériennes, l'administration IP produit donc moins de perturbations respiratoires de son fait. Depuis la cavité abdominale, les solutions pourraient irriter le diaphragme mais aucune toux, ni aucun hoquet n'a été observé.

Enfin, l'injection à volume fixe a été choisie car l'étendue des doses envisagées, en particulier pour l'éthanol, aurait nécessité, à concentration fixe, l'injection de volumes croissants dans un rapport de 1 à 36. De telles variations imposent des procédures d'injection différentes (taille d'aiguille et de seringue, temps d'injection) qui auraient induit des différences dans le stress des animaux. Le volume d'injection a donc été fixé *a priori*, après consultation d'un membre de notre comité d'éthique animale, à 10 mL.kg⁻¹. Il correspond aux bonnes pratiques rapportées (Diehl et coll., 2001) mais a réduit la gamme de doses possibles.

1 Ethanol

L'éthanol a été abondamment étudié en raison de la prévalence de son usage et des conséquences sanitaires de sa consommation. Cette molécule, simple (C_2H_6O), de masse molaire $46,07 \text{ g.mol}^{-1}$, est miscible à l'eau et à certains solvants polaires et apolaires. Dans le corps, elle se répartit avec l'eau et traverse les membranes cellulaires. Si plusieurs systèmes enzymatiques plus ou moins spécifiques existent pour sa métabolisation, il n'a pas encore été identifié de récepteur ou d'effecteur qui lui soit spécifique. Cette absence de spécificité en fait un toxique « faible » mais les quantités consommées (environ 10 g par verre) aboutissent à des concentrations toxiques. Les mécanismes de la toxicité de l'éthanol sont assez peu spécifiques par défaut d'effecteur. Les systèmes et récepteurs sensibles à l'alcool sont perturbés en fonction de leur susceptibilité et de la concentration en éthanol de leur environnement. Les conditions d'essai ou d'expérimentation prennent alors une grande importance en raison de la multiplication des situations, d'où l'abondance de points de vue divergents dans la littérature scientifique (Pohorecky and Brick, 1988).

Dans notre modèle, la relative « faible » toxicité de l'éthanol a impliqué l'administration de doses de plusieurs g.kg^{-1} , alors que sa densité, inférieure à l'eau, et ses propriétés irritantes nous limitaient. Lors de la conception des protocoles, nous avons décidé de tester des doses d'éthanol de $0,125 \text{ g.kg}^{-1}$ à $4,5 \text{ g.kg}^{-1}$. La dose maximale ne dépasse pas la DL_{50} à 24 heures ($DL_{50/24 \text{ h}}$) établie par Ward et coll. à $5,1 \text{ g.kg}^{-1}$ sur des rats Sprague-Dawley de 130 à 150 g (Ward et coll., 1972), ni celle établie à $5,5 \text{ g.kg}^{-1}$ sur des rats Wistar de 14 semaines par Wiberg et coll. (Wiberg et coll., 1970). Aucun rat n'est mort pendant les études pléthysmographiques. Lors de la récupération des sondes de télémétrie après sacrifice, seule la cavité abdominale des rats ayant reçu la plus forte dose a présenté un liquide rosé. Le caractère irritant des solutions alcooliques à forte concentration, dans notre cas 450 g.L^{-1} soit

56°, pourrait expliquer la présence de sang dans la cavité péritonéale, pour autant la péritonite chimique induite par des solutions alcoolisées à forte teneur n'apparaît pas avant 72 heures (Wiberg et coll., 1969), et nous observons les effets respiratoires précoces, dans les 4 premières heures après l'administration.

La DL_{50} à 14 jours ($DL_{50/14 j}$) a été déterminée à $3,6 \text{ g.kg}^{-1}$ par la méthode up-and-down. Cette valeur est inférieure à celles rapportées (Wiberg et coll., 1970, Ward et coll., 1972) mais en adéquation avec les constats formulés.

- La DL_{50} est inversement proportionnelle au titre éthanolique (Wiberg et coll., 1970). Travaillant à volume constant, les solutions d'éthanol utilisées étaient plus concentrées que celles des études rapportées.
- La résistance des rats à la toxicité de l'éthanol diminuent avec l'âge (Wiberg et coll., 1970, Kimura et coll., 1971, Wiberg et coll., 1971). Notre modèle animal est plus âgé que celui de Ward.

Enfin nous avons établi une $DL_{50/14 j}$, l'augmentation du délai d'observation peut aussi expliquer la diminution relative de la valeur déterminée.

Après les premières expérimentations et les premiers dosages, nous avons décidé de maintenir la dose à $4,5 \text{ g.kg}^{-1}$ bien qu'elle soit supérieure à la $DL_{50/14 j}$ déterminée. Aucun animal n'est mort pendant l'étude pléthysmographique. Pour les autres études, la dose maximale testée, a été fixée à 3 g.kg^{-1} , correspondant cliniquement et médicolégale à une intoxication sévère sans que l'alcool puisse expliquer à lui seul le décès (Lamiable et coll., 2000).

1.1 Cinétiques sanguines de l'éthanol et des acides organiques

Le premier objectif de la détermination des cinétiques sanguines était de vérifier la correspondance des concentrations obtenues avec l'imprégnation alcoolique humaine plausible. Les C_{max} obtenues s'échelonnent de 62 à 5130 mg.L^{-1} . Ils correspondent en toxicologie humaine aux concentrations retrouvées lors d'imprégnations alcooliques infracliniques jusqu'aux imprégnations massives potentiellement mortelles (Deveaux, 1999), les éthanolémies supérieures à 5 g.L^{-1} provoquant chez l'homme des dégâts neurologiques irréversibles fréquemment fatals en l'absence de traitement symptomatique (Kaye and Haag, 1957).

A titre de comparaison, le « nouveau » mode de consommation d'alcool, nommé « binge drinking⁽⁵⁾ » expose certains de ses adeptes à des consommations cumulées de plus de 170 g d'éthanol (entre 2 à 3 g.kg^{-1}). Cinq heures après le début de consommation certains présentent encore des éthanolémies de plus de 1,7 g.L^{-1} (Hughes et coll., 2011). Dans une étude rétrospective des cas d'alcoolisation d'adolescents ayant abouti à une hospitalisation entre 2000 et 2010, l'éthanolémie moyenne à l'admission était de 1,76 g.L^{-1} , le maximum de 3,60 g.L^{-1} (Bouthoorn et coll., 2011).

Les doses d'éthanol choisies dans notre modèle sont donc en adéquation avec une consommation humaine, qu'elle soit modérée ou massive et toxique.

~ ~ 0 ~ ~

Dans un second temps, les paramètres cinétiques obtenus ont été étudiés afin de confronter notre modèle à ceux déjà rapportés.

⁽⁵⁾ Le « binge drinking » consiste à s'adonner à une alcoolisation massive dans le but d'atteindre rapidement l'ivresse. Ce phénomène a fait son apparition au début des années 2000.

Les paramètres cinétiques artériels apparents montrent que les éthanolémies croissent avec les doses (Augmentation des C_{max} et $AUC_{0 \rightarrow 240}$). L'absorption et l'élimination sont aussi sensibles à la dose. L'augmentation du T_{max} avec la dose est en faveur d'une absorption d'ordre 1 alors que la réduction de CL/F_{IP} en faveur d'une élimination non linéaire.

La modélisation de population des cinétiques artérielles a aboutit à un modèle à 1 compartiment avec une absorption d'ordre 1 et une élimination de type Mickaelis-Menten. Ce modèle, qui corrobore les constats émis suite à l'analyse des paramètres apparents, décrit correctement l'évolution cinétique de l'ensemble des groupes. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de modélisation de population concernant des éthanolémies chez le rat après administration IP mais pris un à un les composants de ce modèle sont cohérents avec les études rapportées.

Absorption

La comparaison de la vitesse d'absorption de l'éthanol est délicate car elle serait dépendante de la concentration et du volume des solutions injectées (Linakis and Cunningham, 1979). Pour autant, elle est décrite comme plus rapide en IP que *per os* (Gilliam et coll., 1985) et le k_a obtenu avec notre modèle ($8,1 \text{ h}^{-1}$) reste cohérent puisque supérieur à celui retenu *per os* par Pastino et Connolly ($4,2 \text{ h}^{-1}$) (Pastino and Connolly, 2000).

Distribution

Le V_d/F_{IP} déterminé par modélisation est un volume apparent de distribution qui ne tient pas compte de la biodisponibilité dans notre étude. L'éthanol se distribue avec l'eau corporelle, il a d'ailleurs été utilisé pour déterminer l'eau corporelle totale (Kalant, 1996). Il est logique que V_d/F_{IP} soit supérieur à ce que l'on pourrait s'attendre puisque la biodisponibilité de l'éthanol par voie IP ne peut être qu'inférieure ou égale à 1. L'eau

corporelle totale des rats Sprague-Dawley a été déterminée à 71 % (Cunningham et coll., 1986). En considérant la règle établie de distribution de l'éthanol avec l'eau (Kalant, 1996), le volume théorique de distribution devrait être de $0,71 \text{ L.kg}^{-1}$. La biodisponibilité IP (F_{IP}) de l'éthanol dans notre modèle peut être alors estimée à environ 78 %.

Métabolisme et élimination

L'éthanol est essentiellement éliminé par voie métabolique. Ces mécanismes ont été clairement établis (Jacobsen, 1952, Forsander and Raiha, 1960, Lundquist et coll., 1962). Principalement réalisés dans le foie, ils mettent en jeu différents systèmes enzymatiques : alcool-déshydrogénase (EC1.1.1.1 ou alcohol: NAD^+ oxidoreductase) ; MEOS (microsomal ethanol-oxidizing system : système microsomal d'oxydation de l'éthanol) (EC1.14.14.1 ou substrate, reduced-flavoprotein: oxygen oxidoreductase) ; catalase (EC1.11.1.6 ou hydrogen-peroxide: hydrogen-peroxide oxidoreductase) ; aldéhyde-déshydrogénase (EC1.2.1.3 ou aldehyde: NAD^+ oxidoreductase), dans des proportions encore discutées (Mezey, 1976, Matsumoto and Fukui, 2002). L'acétaldéhyde, produit lors de la première étape, reste pratiquement indécélable dans les prélèvements sanguins, puisqu'il est très rapidement oxydé en acétate libre (Sarkola et coll., 2002).

L'élimination de l'éthanol est correctement modélisée par un modèle de type Mickaelis-Menten. Ce constat a déjà été établi par différents auteurs, chez l'homme (Wilkinson, 1980), le rat (Makar and Mannering, 1970), le singe (Makar and Mannering, 1970), la souris (Bejanian et coll., 1990), le chien (Wilkinson et coll., 1980) et le cochon (Koren et coll., 1989). Depuis quelques années, ce type d'élimination non linéaire est retenu pour modéliser les cinétiques sanguines de l'éthanol dans des formes plus ou moins complexes à une ou plusieurs composantes mickaeliennes selon les organes et les systèmes enzymatiques considérés.

Pour sa comparaison aux valeurs mentionnées dans la littérature, il est difficile de distinguer le V_d/F_{IP} de V_{max} . En effet, dans les articles publiés, il est souvent fait mention de la vitesse d'élimination de l'éthanol. Cette vitesse peut être estimée par $\frac{V_{max}}{V_d}$ et exprimée selon l'unité : $mg.L^{-1}.min^{-1}$ ou $mg.L^{-1}.h^{-1}$. Dans notre étude, la vitesse d'élimination de l'éthanol pour notre population est proche de $500 mg.L^{-1}.h^{-1}$. Cette valeur est comparable à celles rapportées dans d'autres études avec un modèle animal similaire au nôtre, le rat Sprague-Dawley mâle :

- entre 480 et 500 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ pour Makar (Makar and Mannering, 1970) ;
- entre 300 et 600 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ pour Silveri (Silveri and Spear, 2000) ;
- entre 400 et 450 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ pour Kelly (Kelly et coll., 1987) ;
- estimée à partir des données de Taylor entre 375 et 500 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ (Taylor et coll., 2009).

La principale différence entre notre étude et celles rapportées consiste en l'évolution de V_{max} en fonction de la dose, les autres paramètres cinétiques (k_a , V_d/F_{IP} et K_m) n'étant pas influencés par celle-ci. Ainsi sur l'étendue des doses testées, comme V_{max} diminue alors que V_d/F_{IP} est constant, la vitesse d'élimination de l'éthanol diminue avec la dose. Cette baisse pour les fortes doses explique le maintien de l'éthanol à de fortes concentrations artérielles après le T_{max} . Le V_{max} est corrélé dans notre étude à la dose, la température et le pH mais ces deux derniers paramètres sont eux-mêmes corrélés à la dose.

Cette réduction de la vitesse d'élimination n'a pas été observée dans toutes les autres études. Silveri et Spear rapporte une même vitesse d'élimination et une même hypothermie pour ces groupes recevant 1,5 et 4,5 $g.kg^{-1}$ (Silveri and Spear, 2000) et confirme le constat de Ferko et Bobyock : pour une voie d'administration donnée, la vitesse d'élimination de

l'éthanol reste constante quelque soit la dose (Ferko and Bobyock, 1979). Pour autant, Ferko et Bobyock n'ont pas étudié de doses supérieures à 2 g.kg^{-1} par voie IP. Et bien qu'ils observent une hypothermie à partir de $1,75 \text{ g.kg}^{-1}$, ils excluent toute participation de la température corporelle à la vitesse d'élimination de l'éthanol, dans une autre étude présentant les mêmes limites (2 g.kg^{-1} , IP) (Ferko and Bobyock, 1978).

Certains auteurs ont incriminé les conséquences de l'hypothermie induite par l'éthanol dans la réduction de la vitesse d'élimination de celui-ci. MacGregor et coll. expliquent cette baisse par une réduction de la perfusion hépatique et du volume de distribution, conséquences de l'hypothermie. La température n'aurait pas d'action directe sur les systèmes enzymatiques (Macgregor et coll., 1965). Larsen et Krarup qui ont travaillé sur des foies perfusés de chat rapportent que l'hypothermie provoquerait une modification de la perfusion intrahépatique et une baisse de l'excrétion biliaire. Ces modifications réduiraient les capacités fonctionnelles du foie et affecteraient ainsi l'élimination de l'éthanol, mais les auteurs n'excluent pas une influence directe de la température sur le métabolisme de l'éthanol (Larsen, 1971, Krarup and Larsen, 1972). Romm et Collins ont observé la baisse de l'élimination de l'éthanol chez la souris après avoir induit une hypothermie au phénobarbital ou au di-isopropylfluorophosphate (un inhibiteur irréversible des acétylcholinestérases) mais ces hypothermies sont moins efficaces que celle induite par l'éthanol. Cette observation est en faveur de la coexistence d'autres facteurs éthanol-dépendants : comme la modification de la perfusion sanguine de certaines organes ou une inhibition du métabolisme (Romm and Collins, 1987). Avec un modèle mathématique proche du nôtre, Koren et coll. ont noté une réduction de V_d et de V_{\max} chez le porcelet. Ils expliquent ces modifications par les conséquences de l'hypothermie : réduction du flux sanguin, séquestration d'eau dans les capillaires, diminution de la consommation en oxygène (Koren et coll., 1989). Enfin, Bejanian et coll. ont confirmé la réduction de la vitesse d'élimination de l'éthanol chez la souris et montré des différences de

répartition de l'alcool entre le sang et le cerveau en fonction de l'intensité de l'hypothermie, ce qui corrobore la variation de perfusion des organes selon la température (Bejanian et coll., 1990). Lors d'une hypothermie, le sang est redistribué depuis le tube digestif, les extrémités, le foie et les reins vers les coronaires et le cerveau, le volume de sang éjecté par le coeur est réduit et l'eau est séquestrée. Toutes ces modifications contribuent à une réduction du volume intravasculaire de distribution de 10 à 35 % (van den Broek et coll., 2010), mais nous ne l'avons pas mis en évidence dans notre étude. Enfin, pour Mortensen et Dale qui ont travaillé directement sur le tissu hépatique, la température a une influence directe sur plusieurs systèmes enzymatiques dont l'alcool déshydrogénase (Mortensen and Dale, 1995). Si les autres auteurs ne l'ont jamais tout à fait exclu, la part relative de cet effet leur semble plus faible que celui des variations circulatoires.

Une action inhibitrice de l'éthanol sur l'alcool-déshydrogénase soit directe, soit par l'intermédiaire de son premier métabolite : l'acétaldéhyde a aussi été rapportée (Zahlten et coll., 1980, Braggins and Crow, 1981, Crabb et coll., 1981, Sharkawi, 1984), mais la vitesse d'élimination de l'éthanol ne semble pas corrélée aux concentrations d'alcétaldéhyde (Inoue et coll., 1984) et la consommation des cofacteurs enzymatiques ne semblent pas, non plus, limiter le métabolisme de l'éthanol (Braggins and Crow, 1981). Plus récemment, l'hypothèse de plusieurs interventions (alcool déshydrogénase puis aldéhyde déshydrogénase) limitant le métabolisme de l'éthanol a été avancée (Page et coll., 1991).

Ces mécanismes, modifications de la perfusion sanguine, réduction de l'activité enzymatique par la température et par les substrats eux-mêmes, ne sont pas contradictoires. Ils peuvent justifier notre observation de la réduction de la vitesse d'élimination de l'éthanol. Par contre notre étude ayant été optimisée pour l'observation des effets respiratoires nous ne disposons pas d'éléments susceptibles de confirmer ou infirmer les hypothèses émises dans la littérature.

Les valeurs de Km mentionnées dans la littérature divergent de la nôtre : $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$:

- 7 ou 23 mg.L^{-1} pour Pastino chez le rat F-344 mâle ou femelle de 10 semaines (Pastino et coll., 1997, Pastino and Conolly, 2000) ;
- 34 mg.L^{-1} pour Fung chez le rat Spargue-Dawley mâle de 300 g (Fung et coll., 2008) ;
- 10 mg.L^{-1} pour Kozawa chez le rat Wistar mâle de 350 g (Kozawa et coll., 2007) ;
- 124 mg.L^{-1} pour Makar chez le rat Sprague-Dawley mâle de 250 à 300 g (Makar and Mannering, 1970).

La disproportion entre les concentrations sanguines et cette constante peut expliquer sa mésestimation lorsque les cinétiques employées ne détaillent pas suffisamment la phase finale d'élimination. Ce qui est notre cas puisque notre protocole a été optimisé pour l'étude pléthysmographique et que nous n'avons suivi les cinétiques que pendant 4 heures, or, pour les plus fortes doses, l'éthanol n'est pas complètement éliminé durant cette période.

~ ~ 0 ~ ~

La comparaison des paramètres cinétiques de l'éthanol entre le sang artériel et le sang veineux, montre que ce dernier est moins concentré que l'artériel (C_{max} et $AUC_{0 \rightarrow 240}$ plus faibles pour le groupe à 3 g.kg^{-1} , $p < 0,05$). Cette différence entre le sang artériel et le sang veineux a déjà été décrite et étudiée (Haggard et coll., 1940, Wilkinson and Rheingold, 1981, Martin et coll., 1984), en particulier par l'équipe de A. W. Jones (Jones et coll., 1989, Jones et coll., 1997, Jones et coll., 2004). Attribuée à la différence de vitesse entre l'absorption et la distribution de l'éthanol, elle explique la sous-estimation de l'imprégnation alcoolique après l'analyse d'un échantillon de sang veineux prélevé précocement lors de la phase d'absorption, phase pendant laquelle les effets toxiques de l'éthanol sont décrits comme maximum (effet de Mellanby) (Jones, 1993).

~ ~ 0 ~ ~

Le métabolisme de l'éthanol aboutit en deux étapes à l'acétate, qui est éliminé du foie par la veine sus-hépatique puis distribué *via* la circulation artérielle vers les organes extrahépatiques capables de l'assimiler, en particulier les muscles squelettiques (Lundquist et coll., 1962, Forney and Harger, 1969). L'augmentation observée des concentrations sériques en acétates est la conséquence du métabolisme de l'éthanol. La différence artérioveineuse de concentration serait due à la distribution et à la consommation des acétates par les tissus extrahépatiques, le sang veineux est moins concentré (Lundquist et coll., 1973, Juhlin-Dannfelt, 1977). Seule une ponction de sang au niveau de la veine sus-hépatique aurait permis d'observer une concentration veineuse supérieure à la concentration artérielle. A 3 g.kg^{-1} d'éthanol, les concentrations en acétate présentent un plateau traduisant une saturation des mécanismes enzymatiques de production (métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde) (Braggins and Crow, 1981, Page et coll., 1991) et/ou d'élimination (métabolisme de l'acétate).

Une modélisation du rapport entre la concentration artérielle des acétates, la concentration artérielle de l'éthanol et les températures centrales a été initiée, au moment de la rédaction de ce document, elle n'a pas encore abouti.

~ ~ 0 ~ ~

Les concentrations basales en lactates retrouvées dans le sérum artériel ($1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) sont équivalentes à celles ($1,1 \text{ mmol.L}^{-1}$) rapportées chez le rat (Cohen and Woods, 1976).

L'influence de la prise d'éthanol sur la concentration sérique des lactates est encore discutée. Dans certaines études ou cas cliniques, la concentration est augmentée (Lundquist et coll., 1962, Lundquist et coll., 1973, Lieber, 1975, Juhlin-Dannfelt, 1977, Lien and Mader, 1999, Sarkola et coll., 2002), ou se maintenait (Auzepy et coll., 1985, Fulop et coll., 1986,

MacDonald et coll., 1994) ou encore baissait (Masson et coll., 1992, Nicholas et coll., 2008). Pour ces derniers auteurs, l'augmentation de la lactatémie après absorption d'éthanol serait la conséquence de phénomènes ou pathologies associées.

Pour d'autres auteurs, les variations positives ou négatives de la lactatémie artérielle après l'administration d'éthanol auraient en partie pour origine le métabolisme de l'éthanol qui modifie l'équilibre des cofacteurs enzymatiques : $\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$ (Forsander et coll., 1965, Forsander, 1966, Forney and Harger, 1969, Sarkola et coll., 2002). Cette modification a des conséquences sur le cycle de Krebs (Lopez et coll., 2004), sur la glycolyse (Forney and Harger, 1969, Masson et coll., 1992), sur la néoglucogenèse hépatique à partir des lactates (Forney and Harger, 1969, Efthivoulou et coll., 1995, Lopez et coll., 2004, Nicholas et coll., 2008) et sur la céto-genèse (Lopez et coll., 2009). Les variations de lactatémies seraient aussi dues à des modifications d'incorporation et d'utilisation des lactates lors du métabolisme de l'éthanol (Lundquist et coll., 1962, Kreisberg et coll., 1971a, Eiser, 1987), auxquelles l'acétate pourrait participer (Topping et coll., 1984).

Lors de notre étude, aucune variation significative des lactates artériels, à l'exception du groupe à $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$ à 20 min, n'a été observée. Cette augmentation isolée à faible dose est surprenante. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées, (1) soit l'action du métabolisme de l'éthanol sur la synthèse des lactates est biphasique avec augmentation de ceux-ci à faible dose et inhibition à plus fortes doses, (2) soit leur libération est inhibée aux plus fortes doses d'éthanol par action sur leur transport transmembranaire directement par l'alcool ou *via* ses métabolites (Cf. 3 Acide gamma hydroxybutyrique) et leur synthèse est masquée. En l'absence d'autre effet significatif de la dose d'éthanol sur les lactates artériels, nos investigations se sont arrêtées là.

Par contre, les concentrations basales en lactates dans le sang prélevé au niveau des veines de la queue sont élevées ($6,1 \text{ mmol.L}^{-1}$) dans tous les groupes, alors qu'aucune hémolyse n'a été décelée dans les prélèvements sanguins, et elles ne semblent pas liées à l'administration d'éthanol. A l'exception du site de prélèvement, les conditions expérimentales et le traitement des échantillons sont identiques pour les deux protocoles et ne peuvent expliquer la différence, de près de 5 mmol.L^{-1} . Les lactatémies artérielles obtenues n'ont pas présenté cette élévation inexpliquée. De telles lactatémies veineuses ont précédemment été rapportés chez des rats Wistar mâle de 250 à 500 g lors d'exercices physiques intenses (Gobatto et coll., 2001, Manchado Fde et coll., 2006). Dans notre étude, tous les animaux étaient placés en boîte de contention et leurs mouvements étaient très réduits, seule la queue était libre. La queue des rats est un organe essentiellement osseux et tendineux et participe à la thermorégulation. Son débit sanguin varie en fonction de la température. Pour autant, une augmentation des concentrations liée à la réduction du flux sanguin, conséquemment à l'hypothermie, aurait provoqué un accroissement similaire des concentrations veineuses en éthanol et en acétate, ce qui n'a pas été observé. Seul le mode de prélèvement de notre étude se distingue de ceux pratiqués précédemment. Nous avons placé un cathéter court dans l'une des veines caudales latérales alors qu'une saignée au niveau de la queue était réalisée dans les autres études (Gobatto et coll., 2001, Manchado Fde et coll., 2006). Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises. Soit l'emploi d'un cathéter, soit le réchauffement ou le massage de la queue, parfois nécessaires au recueil de sang, ont déclenché une libération locale de lactate.

Finalement, les prélèvements sanguins au niveau des veines caudales n'ont pas permis l'étude des lactates après administration d'éthanol. L'origine des lactatémies veineuses élevées n'a pas pu être identifiée. Dans une future étude, il conviendrait de vérifier si le

prélèvement par saignée, tout autre paramètre conservé, permet d'observer les mêmes lactatémies.

1.2 Effets de l'éthanol

Bien que notre modèle animal ait été optimisé pour l'étude des paramètres respiratoires par pléthysmographie, il a également permis d'observer les effets cliniques sur des animaux libres de leur mouvement. Par contre, l'état de conscience a été plus facile à vérifier lors des études cinétiques ou des gaz du sang, l'animal étant accessible et stimulant.

Nos observations concernant la conscience des animaux après administration d'éthanol sont conformes aux effets rapportés. Seuls les animaux des groupes 3 et 4,5 g.kg⁻¹ ont montré une altération franche de la conscience. Or, la sédation, effet connu de l'éthanol, apparaît dès la dose de 2 g.kg⁻¹ chez le rat Sprague-Dawley mâle de 350 à 430 g selon Chuck et coll. (Chuck et coll., 2006) ou dès des doses supérieures à 0,5 fois la DL₅₀, soit 2,6 g.kg⁻¹ chez le rat mâle albinos dans l'étude de Bonitenko et coll.. Cette altération de la conscience, pouvant aller jusqu'au coma, est rapportée comme une inhibition marquée du SNC avec baisse des réaction aux stimuli extérieurs et l'apparition progressive de troubles respiratoires et circulatoires (Bonitenko et coll., 2010). L'incoordination motrice et la sédation sont attribuées en partie à l'interaction de l'éthanol avec le système GABAergique et plus particulièrement avec les récepteurs GABA_A. Ces récepteurs ionotropes se composent de 5 sous-unités parmi les six classes de sous-unités (α , β , γ , δ , ρ et ϵ), chaque classe présentant plusieurs isoformes. Il existe de nombreux récepteurs GABA_A en raison du nombre de combinaisons possibles. Chaque sous-unité possède 4 domaines transmembranaires. Leur activation ouvre un canal chlore (Bormann, 2000). En fonction de la composition du récepteur GABA_A, la sensibilité à l'éthanol, ainsi qu'à d'autres substances comme les benzodiazépines, diffère (Pohorecky and Brick, 1988, Deitrich et coll., 1989, Nutt and Peters, 1994, Faingold et

coll., 1998, Grobin et coll., 1998, Santhakumar et coll., 2007). Le mécanisme d'interaction de l'éthanol avec le récepteur GABA_A n'est pas tout à fait élucidé, il pourrait être direct (Olsen et coll., 2004, Santhakumar et coll., 2007) ou indirect par l'intermédiaire de neurostéroïdes (Morrow et coll., 2001, Sanna et coll., 2004). L'action de l'éthanol sur le récepteur GABA_B n'est pas clairement établie chez le rat.

L'éthanol pourrait provoquer aussi ses effets sédatifs par interaction avec les récepteurs aux acides aminés excitateurs (glutamate et aspartate), plus particulièrement le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et dans une moindre mesure les récepteurs non-NMDA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole (AMPA) et kainate, les effets de l'éthanol étant similaires à ceux d'antagonistes spécifiques (Nutt and Peters, 1994, Faingold et coll., 1998). La participation des deux systèmes GABA_A et NMDA aux effets comportementaux et sédatif a été établi dans une étude sur le rat Wistar de 200 à 250 g (Beleslin et coll., 1997). Certains auteurs ont rapportés la possible participation des opioïdes endogènes (Olson et coll., 1984) mais elle semble inconstante (Lignian et coll., 1983).

L'antagonisme et l'agonisme de ces différents récepteurs : GABA_A et NMDA n'ont pas été testés lors de nos travaux et leur participation ne peut être discutée avec nos résultats.

Dans notre étude, les altérations de la conscience ne sont apparues que chez des individus présentant une hypothermie marquée, cette dernière a pu participer à l'altération de la conscience des rats.

~ ~ O ~ ~

L'observation d'hypothermies lors de l'administration de doses massives d'éthanol est cohérente avec le dérèglement du système de thermorégulation qu'il déclenche. Lors de notre étude, la température des chambres de pléthysmographie étant inférieure à la température corporelle, l'éthanol a eu un effet hypothermisant (Freund, 1973, Myers, 1981, Rezvani et

coll., 1986, Wasielewski and Holloway, 2001) et l'hypothermie a été dose-dépendante (Freund, 1973, Linakis and Cunningham, 1979, Murray et coll., 1986), plus marquée pour la dose à $4,5 \text{ g.kg}^{-1}$ que pour 3 g.kg^{-1} . Ce dérèglement de la thermorégulation a fait l'objet de nombreuses études et pourrait être imputé à l'action de l'éthanol au niveau de l'hypothalamus (sur de nombreux médiateurs cérébraux : dopamine, noréphédrine, sérotonine, histamine, acétylcholine, acides aminés, neuropeptides) plus qu'à la modification du métabolisme ou à la déperdition d'énergie observées (Lomax et coll., 1981) qui en seraient les conséquences (Kalant and Le, 1983). L'évolution de la température reste dépendante des conditions ambiantes (Freund, 1973), bien qu'il semble s'agir d'un déplacement de la valeur de contrôle (Kalant and Le, 1983). Ce déplacement est imputé plus particulièrement à l'action de l'éthanol sur la libération de la sérotonine et/ou de la norépinephrine au niveau du noyau préoptique de l'hypothalamus (Huttunen and Myers, 1985, Huttunen et coll., 1988, Wasielewski and Holloway, 2001) quoique cette hypothèse reste encore discutée (Murphy and Lipton, 1983, Ticho et coll., 1992, Carlton et coll., 1995). La cinétique et l'intensité de l'hypothermie sont donc influencées par la température ambiante, le type de mesure de la température (rectale ou centrale), la dose et la cinétique de l'éthanol (conséquence pour partie de la voie d'administration).

Après comparaison de nos résultats à ceux publiés pour des modèles équivalents, il s'avère que quelques auteurs ont rapporté des hypothermies dès $1,5 \text{ g.kg}^{-1}$ chez le rat Sprague-Dawley (Silveri and Spear, 2000, Taylor et coll., 2009) alors que nous n'en avons observé que pour les groupes à 3 et $4,5 \text{ g.kg}^{-1}$.

Dans leur étude, Silveri et Spear ont observé une hypothermie similaire pour des doses de 1,5 et $4,5 \text{ g.kg}^{-1}$ chez des rats Sprague-Dawley de 8 semaines (équivalent à notre modèle). Les principales différences entre leur étude et la nôtre viennent de l'utilisation de boîtes de contention opaques et de sondes rectales non à demeure. Ces deux facteurs ont pu déclencher

un stress différent de celui généré par notre protocole. D'ailleurs plusieurs études rapportent que certaines situations, comme la manipulation des animaux lors de la prise de température rectale, les stressent et accentuent l'hypothermie induite par l'éthanol (Peris and Cunningham, 1986, Cunningham and Bischof, 1987, Peris and Cunningham, 1987, Ristuccia et coll., 2007). De son côté, Taylor qui a utilisé des sondes de télémetrie, a travaillé avec des animaux plus âgés (12-13 semaines), or, en vieillissant, la sensibilité des rats Sprague-Dawley à l'effet hypothermique varie en fonction des doses et des conditions expérimentales (Ristuccia and Spear, 2004, Ristuccia et coll., 2007, Ristuccia and Spear, 2008). Enfin, avec un protocole similaire au nôtre (voie d'administration et concentration des solutions), Huttunen et coll. ont trouvé une hypothermie analogue chez le rat Sprague-Dawley mâle de 380 g pour une dose de 3 g.kg^{-1} à 20°C (Huttunen et coll., 1998), et Gallaher et Egner, avec des rats Wistar mâles de 11 à 19 semaines, rapportent des hypothermies analogues aux nôtres pour des doses de 2 à 6 g.kg^{-1} (Gallaher and Egner, 1985).

Nous avons choisi de standardiser le protocole et les conditions ambiantes afin d'optimiser le stress et ses conséquences lors de l'étude pléthysmographique. Ces précautions ont abouti à un protocole unique d'administration, où tous les rats sont manipulés de la même manière dans les mêmes délais. Nous émettons alors l'hypothèse qu'en dehors de l'effet dose ou concentration de l'éthanol, le stress généré est le même pour tous les animaux. L'hypothermie observée lors de l'étude pléthysmographique aurait donc pour origine l'éthanol. Par contre, nous ne pouvons pas exclure une participation d'effets non pharmacologiques comme le stress généré par une irritation ou une gêne locale de la zone d'administration.

~ ~ 0 ~ ~

Dans la littérature, plusieurs études rapportent des effets respiratoires pour l'éthanol. Lors d'une étude récente sur le rat mâle de 180 à 220 g, Rejniuk et coll. ont observé une réduction de f (bradypnée) dans les 3 heures qui suivaient l'administration intragastrique d'une dose environ 1,4 fois supérieure à la $DL_{50/48\text{ h}}$, soit environ $20,5\text{ g.kg}^{-1}$ (Rejniuk et coll., 2008). Une bradypnée a été aussi rapportée par Brackett et coll. après administration intragastrique d'une dose de 6 g.kg^{-1} chez des rats Sprague-Dawley mâles de 300 g (Brackett et coll., 1994). Après perfusion intraveineuse d'éthanol à des doses cumulées de $0,6\text{ g.kg}^{-1}$ qu'ils estimaient produire une concentration sanguine de $7,5\text{ g.L}^{-1}$, Pagala et coll. ont observé une réduction de 83 % de f chez des rats Sprague-Dawley de 150 g (Pagala et coll., 1995). Haggard rapportait en 1940 un arrêt respiratoire chez les rats à des concentrations sanguines de $9,3\text{ g.L}^{-1}$ (Haggard et coll., 1940). Les auteurs rapportant les bradypnées ne semblent pas avoir étudié les volumes respiratoires V_T ou V_E or malgré la baisse de fréquence, la ventilation a pu être conservée.

Ce type de modification du mode respiratoire a aussi été rapporté pour d'autres espèces animales : chez le chien dès 4 g.L^{-1} d'éthanol dans le sang, quand l'intoxication alcoolique s'est poursuivie, ils sont décédés par arrêt respiratoire principalement (Loomis, 1952, Klingman et coll., 1958), chez la souris (Gilliam and Collins, 1983) et chez le chat anesthésié (Rosenstein et coll., 1968).

Apparemment, nos observations ne corroborent pas ces résultats. L'étude pléthysmographique que nous avons menée n'a permis d'observer qu'une tendance à l'augmentation de f (tachypnée) pour le groupe 3 g.kg^{-1} lors de la première heure et pour le groupe $4,5\text{ g.kg}^{-1}$ après la première heure. Cette dernière observation est accompagnée d'une tendance à la réduction de T_E mais V_E est préservé. Ces résultats peuvent être la conséquence des caractéristiques de notre protocole. Ainsi, bien que la plus forte dose, $4,5\text{ g.kg}^{-1}$, soit supérieure à la $DL_{50/14\text{ j}}$ d'un facteur de près de 1,25, les concentrations sanguines, auxquelles

la bradypnée à été observée par certains auteurs (Loomis, 1952, Klingman et coll., 1958, Pagala et coll., 1995), n'ont pas été atteintes. Le délai post-opératoire minimal de 4 jours après installation de la sonde de télémétrie nous assure de la complète élimination des anesthésiques, alors que Brackett initiait l'expérimentation 90 min après la récupération du réflexe de redressement en s'étant assuré de la normalité d'un certain nombre de paramètres cardiovasculaires, métaboliques et neurologiques et de l'absence de toute interaction cinétique et métabolique sur l'éthanol (Brackett et coll., 1994). Pour autant après un délai si court, il ne peut être exclu qu'une interaction d'ordre dynamique ait eu lieu, provoquant la dépression respiratoire observée. Les effets respiratoires ont été attribués à l'éthanol alors qu'ils pourraient être dus à un phénomène ou une substance associée (Johnstone and Witt, 1972).

La tachypnée que nous avons observée a été rapportée par d'autres équipes. Borison et coll. rapportent une brève stimulation de la respiration après perfusion intracrânienne d'éthanol chez le chat anesthésié (Borison et coll., 1972). Kettunen et coll. ont observée la tachypnée indirectement chez le chien beagle anesthésié, à la dose de 1 g.kg^{-1} , le V_T ayant significativement décru alors que V_E était conservé (Kettunen et coll., 1983). Bonora et coll. rapportent une tachypnée chez le chat intact et éveillé après perfusion IV et maintien d'une éthanolémie à $1,2 \text{ g.L}^{-1}$. Ils émettent l'hypothèse d'une action de l'éthanol sur les afférents vagues mais ne peuvent exclure une activité de celui-ci sur un site rostral du SNC (Bonora et coll., 1984).

Haji et Takeda excluent l'implication des afférents vagues et des sinus carotidiens dans leur observation du raccourcissement de T_E , qu'ils attribuent à l'action de l'éthanol sur le centre de contrôle de la respiration situé dans le bulbe rachidien, avec modifications des influx nerveux commandant les muscles des voies aériennes supérieures (Haji and Takeda, 1987, Takeda and Haji, 1990). L'éthanol pourrait agir par l'intermédiaire du système glycinergique qu'il potentialise (Sebe et coll., 2003, Eggers and Berger, 2004), le système glycinergique

ayant un rôle dans le génération du rythme respiratoire et la modulation de la résistance des voies aériennes supérieures (Busselberg et coll., 2001, Dutschmann and Paton, 2002b, 2002a, Paton and Dutschmann, 2002). Budzinska confirme cet effet sur le nerf hypoglosse chez le lapin mais l'attribue à l'action de l'éthanol sur le système sérotoninergique (Smith et coll., 1975b, 1975a, 1976, Budzinska, 2005). La baisse de tonus musculaire (pharynx, larynx et langue) et l'augmentation des résistances des voies aériennes supérieures seraient d'ailleurs aussi à l'origine des apnées du sommeil observées après alcoolisation (Robinson et coll., 1985, Robinson and Zwillich, 1985, Altose and Hudgel, 1986).

Enfin, Hellström et Tottmar ont rapporté que l'acétaldéhyde, métabolite de l'éthanol, pourrait aussi participer à l'accélération de f (Hellstrom and Tottmar, 1982). Certaines substances directement actives sur le nerf vague et les irritants pulmonaires stimulent ce dernier. Cette stimulation est à l'origine d'une réduction du T_E et du T_I , puis à plus fortes concentrations de l'apparition de pauses expiratoires (Vijayaraghavan et coll., 1993). Or l'éthanol et ses métabolites : l'acétaldéhyde et l'acétate sont des irritants pulmonaires (de Ceaurriz et coll., 1981, Appelman et coll., 1982, Nielsen and Alarie, 1982, Krumpke et coll., 1984, Moser and Balster, 1985, Gagnaire et coll., 2002), ils pourraient alors activer le nerf vague.

La tendance à la baisse de T_E et conséquemment la tachypnée observées aux fortes doses d'éthanol dans notre modèle pourraient être expliquée par ces propriétés de l'éthanol.

~ ~ 0 ~ ~

Comme aucun effet respiratoire dépressur n'a été observé aux doses d'éthanol choisies, contrairement à d'autres études, des épreuves d'hypercapnie et d'hypoxie exogènes aiguës intermittentes ont été réalisées chez le rat traité par l'éthanol à 3 g.kg^{-1} . Ces tests augmenteraient la sensibilité des mécanismes de la respiration à l'action dépressive de

certaines xénobiotiques (Goineau et coll., 2010), cette action a été rapportée pour les opiacés (van den Hoogen and Colpaert, 1986, Nettleton et coll., 2007) et permettent de mettre en évidence une éventuelle activité de l'éthanol après activation des chemorécepteurs :

- lors d'hypercapnie exogène : des chémorécepteurs périphériques artériels sensibles à la PaCO_2 et des chémorécepteurs centraux (bulbe) indirectement sensible à la PaCO_2 pas l'intermédiaire du pH du liquide céphalorachidien ;
- lors d'hypoxie exogène, des chémorécepteurs périphériques artériels sensibles à la PaO_2 , principalement les corps carotidiens et plus secondairement les corps aortiques (Jordan, 1982, Teppema and Dahan, 2010).

La teneur respective de 5 % de CO_2 et de 12 % d' O_2 pour les tests en hypercapnie et hypoxie est comparable à celle rapportée dans la littérature (Taylor et coll., 2005, Bavis et coll., 2006, Davis et coll., 2006, Fuller et coll., 2006, Bavis et coll., 2007, Montandon et coll., 2007, Fuller et coll., 2008, Bell and Haouzi, 2009, Fuller et coll., 2009, Kervern et coll., 2009, Kinkead et coll., 2009, Liu et coll., 2009, Niane et coll., 2009, Wenninger et coll., 2009, Goineau et coll., 2010, Pokorski and Antosiewicz, 2010). Comme décrits précédemment, les animaux ont été exposés à de brèves périodes d'hypercapnie modérée ou d'hypoxie modérée (~ 5 min) entrecoupées de périodes en air. Si la mise en œuvre de cette technique a été pour partie validée par les mesures de la composition en CO_2 et en O_2 des chambres de pléthysmographie avant et après les mesures, la comparaison des variations respiratoires observées sur les valeurs basales avec d'autres études achève cette validation. Ainsi nos résultats obtenus en hypercapnie sont comparables à ceux obtenus dans des conditions similaires avec des rats Wistar mâle de 400 g par l'équipe de Goineau (Goineau et coll., 2010). De même en hypoxie, nos observations sont comparables à celle faite par Wenninger et coll. sur des rats Fisher mâle de 3 à 4 mois (Wenninger et coll., 2009).

Lors des tests en hypercapnie exogène, aucune modification respiratoire significative n'a été observée lors de notre étude chez le rat alcoolisé. Dans une étude ultérieure, il conviendra d'augmenter l'hypercapnie exogène vers 7 à 8 % voire 10 % afin d'écarter toute activité de l'éthanol après activation des chémorécepteurs sensibles à la PaCO_2 et au pH.

Dans la littérature, une étude rapporte l'effet dépressur de l'éthanol en condition d'hypoxie, chez le chien anesthésié, lors d'une hypoxie plus prononcée (10 % d' O_2) et à des concentrations d'éthanol supérieures ($> 5,3 \text{ g.L}^{-1}$ de sang veineux) (Loomis, 1952). Malheureusement, en raison d'un problème d'approvisionnement, l'étude en hypoxie exogène n'a pas pu être menée à terme. Le nombre minimal d'individus témoins n'est pas suffisant.

~ ~ 0 ~ ~

L'analyse des gaz du sang a été menée selon une technique déjà éprouvée dans notre équipe et les valeurs basales correspondent à celles déjà rapportées (Gueye et coll., 2001, 2002, Megarbane et coll., 2005a, Megarbane et coll., 2005b, Megarbane et coll., 2006, Villa et coll., 2007, Pirnay et coll., 2008, Chevillard et coll., 2009). Malgré la différence de souche ou de protocole, ces valeurs basales restent cohérentes avec celles déterminées par Brun-Pascaud après 202 mesures chez 77 rats Wistar mâles de 250 à 380 g éveillés (Brun-Pascaud et coll., 1982), ou par Wang avec des rats Sprague-Dawley adultes anesthésiés ventilés (Wang et coll., 2000), ou encore par Cho avec des rats Sprague-Dawley mâles de 260 à 300 g cathétérisés au niveau de la carotide (Cho et coll., 1994).

A fortes doses (3 et $4,5 \text{ g.kg}^{-1}$), l'éthanol a provoqué chez notre modèle animal une acidémie avec une tendance à la baisse des bicarbonates sanguins. Cette acidémie est contemporaine de la hausse des acétates, ce qui est cohérent avec l'acidose métabolique rapportée pour l'éthanol chez le rat et l'homme (Raeihae and Maeeniaeae, 1964), bien que d'autres acides organiques formés directement ou indirectement depuis l'éthanol, comme les

acétoacétates et les β -hydroxybutyrates, aient pu participer à cette acidémie (Forsander and Raiha, 1960, Forsander et coll., 1965, Forsander, 1966). Les lactates n'ont pas participé à cette acidémie, aucune variation de leur concentration n'est contemporaine du phénomène. Avec un modèle animal équivalent au nôtre, l'équipe de Murray conclut aussi à une acidose métabolique induite par l'éthanol après administration orale (Murray et coll., 1986). D'autres études ont pu rapporter des modifications importantes des gaz du sang, en particulier chez la souris, mais ces observations sont à considérer avec précaution puisque les paramètres ne semblent pas avoir été corrigés par la température de l'animal (Gilliam and Collins, 1982, 1983).

Dans notre étude, les groupes ayant présenté des acidémies : 3 et 4,5 g.kg⁻¹ ont présenté des tachypnées soit transitoire et décalée soit peu intense mais sans modification du V_E , de la PaO_2 ou de la $PaCO_2$.

1.3 Modèle

L'étude des cinétiques sanguines et des effets respiratoires de l'éthanol a permis de mettre en évidence chez le rat mâle Sprague-Dawley de 7 à 9 semaines, après administration IP d'éthanol :

- une cinétique non linéaire, qu'il a été possible de modéliser avec une approche en population selon un modèle à un compartiment avec absorption d'ordre un et élimination de type Michaelis-Menten, la V_{max} décroissant avec la dose. Cette réduction de la vitesse d'élimination pourrait être due : (1) à l'hypothermie induite par l'éthanol qui diminuerait l'activité enzymatique, (2) aux conséquences physiologiques de l'hypothermie ou de l'intoxication alcoolique comme la baisse de la perfusion sanguine, et/ou (3) à une inhibition des enzymes par leur substrat ;

- une différence artérioveineuse entre les concentrations en éthanol et en acétates. Pour l'éthanol, cette différence est perceptible lors de la phase d'absorption et serait due aux mécanismes de distribution. Pour les acétates, elle est observable pendant toute la durée de l'expérimentation et serait due à la consommation par les tissus extrahépatiques des acétates circulants ;
- une acidémie métabolique à des doses supérieures à 3 g.kg^{-1} , expliquée pour partie par la synthèse directe d'acétates lors du métabolisme de l'éthanol mais à laquelle d'autres métabolites comme les acétoacétates et les β -hydroxybutyrates ont dû participer. Cette acidémie est contemporaine d'une tachypnée, celle-ci pourrait être due à l'activité de l'éthanol soit sur le nerf vague soit sur l'influx nerveux contrôlant les muscles respiratoires ;
- un coma et une hypothermie qui pourraient être dus à l'action directe de l'éthanol respectivement sur le système GABAergique et glutamatergique et sur le centre de la thermorégulation.

Tous ces phénomènes ont pu s'influencer mutuellement.

A plus faible dose, l'éthanol n'a provoqué aucun effet significatif et l'étude en condition d'hypercapnie exogène n'a permis de mettre en évidence aucun effet respiratoire de l'éthanol à 3 g.kg^{-1} lors d'une hypercapnie à 5% de CO_2 . A quelques exceptions près, les dépressions respiratoires induites par l'éthanol avaient été rapportées à des doses et des éthanolémies plus conséquentes, voire juste prémortem. Notre modèle n'a pas atteint cette limite, bien que la plus forte dose testée soit égale à 1,25 fois la $\text{DL}_{50/14} \text{ j}$. De telles concentrations auraient pu être atteintes après administration multiple en IP ou perfusion intraveineuse (IV) de l'éthanol mais ces techniques plus contraignantes n'avaient pas été envisagées *a priori*.

Chacune des observations liées à l'administration d'éthanol dans notre modèle a déjà été rapportée chez l'homme :

- les cinétiques sanguines de l'éthanol sont non linéaires (Wilkinson, 1980, Kalant, 1996, Jones, 2000) ;
- les métabolites formés sont les mêmes et les enzymes humaines du métabolisme de l'éthanol sont similaires (Hawkins and Kalant, 1972, Lieber, 1975, Matsumoto and Fukui, 2002) ;
- les perturbations de la thermorégulation induites par l'éthanol sont analogues (Kalant and Le, 1983, Wasielewski and Holloway, 2001) ;
- une acidose métabolique soit de type acidose lactique soit de type cétoacidose est parfois observée (Eiser, 1987, Kraut and Kurtz, 2008) et la conscience est altérée (Vonghia et coll., 2008).

En médecine humaine, l'action de l'éthanol sur la respiration est encore discutée. Certains auteurs rapportent des dépressions respiratoires (Dickerman et coll., 1968, Casali et coll., 1977, Adanir et coll., 2008) ou une stimulation de la respiration (Hitchcock, 1942, Bellville et coll., 1976) mais pour d'autres, isolément l'éthanol n'a que peu d'effets respiratoires (Higgins, 1917, Bobo, 1972). Les effets qui lui sont attribués seraient soit la conséquence de pathologies associées soit dus à la coadministration d'une substance active, potentiellement déprimeur de la respiration (Dundee et coll., 1970, Johnstone and Witt, 1972, Johnstone and Reier, 1973).

Notre modèle animal présente donc des similitudes avec l'homme et son utilisation paraît intéressante pour la compréhension des mécanismes toxiques de l'éthanol. Nous n'avons trouvé aucune étude cinétique ni respiratoire de l'éthanol couvrant une aussi large gamme de doses chez le rat. Les différents champs envisagés : cinétique, signes cliniques, respiration, gaz du sang détaillent les caractéristiques de notre modèle qui sert de base à l'étude des conséquences respiratoires de l'association de l'éthanol à d'autres substances.

2 Association de l'éthanol et du THC

Utilisé comme source de fibres textiles, en médecine, lors de pratiques religieuses et à des fins récréatives depuis quelques millénaires, *Cannabis sativa* ferait partie des premières plantes domestiquées par l'homme (Fleming and Clarke, 1998). Amplement cultivé à des fins textiles tout au long de l'histoire moderne de l'humanité, l'emploi du *Cannabis* comme médicament n'est envisagé en Occident qu'au XIX^{ème} siècle. Cette exportation d'utilisation depuis les Indes vers l'Europe et les Etats-Unis serait le fait de Sir William Brooke O'Shaughnessy, médecin de la compagnie de Indes orientales. L'introduction de ces nouveaux usages va initier l'étude du *Cannabis*, à la fin du XIX^{ème} (Fankhauser, 2008). La popularisation en Occident de la consommation de *Cannabis* à des fins récréatives daterait du milieu du XX^{ème} siècle.

Les cannabinoïdes n'ayant été isolés qu'au début des années 1940, leurs propriétés pharmacologiques ne sont investiguées que depuis cette période. L'intérêt porté à ces substances ayant pour origine deux motivations : l'exploration de leurs propriétés à des fins thérapeutiques et la connaissance des propriétés psychoactives à l'origine de leur usage récréatif et traditionnel. De ces études, il est apparu que le THC est la principale substance psychoactive parmi la soixantaine isolée à partir du *Cannabis*. Le THC possède quelques propriétés pharmacologiques intéressantes, à l'origine de l'autorisation de vente à des fins médicinales du *Cannabis* dans certains pays voire à la mise sur le marché de spécialités pharmaceutiques. Ces médicaments ont pour indication la stimulation de l'appétit chez certains immunodéprimés et la suppression des nausées et vomissements lors des chimiothérapies (Pertwee, 2006). Depuis leur emploi, aucune intoxication mortelle, ni aucun effet secondaire persistant n'a été rapporté (Robson, 2001). Bien entendu, l'essentiel de

l'usage du *Cannabis* est récréatif et en fonction de la législation du pays autorisé, dépénalisé ou interdit et réprimé.

L'essentiel des propriétés pharmacologiques du THC serait dû à l'activation de récepteurs spécifiques et aux perturbations membranaires qu'il peut provoquer. En effet, le THC, fortement lipophile, peut modifier les propriétés physiques de membranes constituées de phospholipides et de cholestérol (Gill, 1976). Ce mode d'action, décelé avant la découverte des récepteurs spécifiques, ne peut être totalement écarté (Pertwee, 2006).

Le THC est agoniste de 2 à 4 récepteurs spécifiques aux cannabinoïdes. Les deux premiers récepteurs ont été découverts et décrits à la fin des années 1980. Nommés CB₁ et CB₂, ces deux récepteurs couplés à protéine-G_i inhibent une adénylate cyclase ou activent une protéine kinase. CB₁ peut aussi être couplé, toujours par l'intermédiaire d'une protéine-G_i, à certains canaux ioniques (+/- potassium ; - calcium) et par l'intermédiaire d'une protéine-G_s à une adénylate cyclase (Pertwee, 2006). CB₁ et CB₂ sont tous deux des protéines à sept domaines intramembranaires et partagent 48 % d'homologie. La composition protéique de ces récepteurs est similaire à plus de 80 % pour CB₂ et 97 % pour CB₁ entre l'humain, le rat et la souris (Howlett et coll., 2002). Les récepteurs CB₁ seraient principalement présynaptiques au niveau de terminaisons nerveuses centrales et périphériques où leur activation inhibe la libération de neurotransmetteur (Freund et coll., 2003, Mackie, 2008). Leur répartition centrale explique les propriétés hypokinétiques, cataleptique et analgésiques des agonistes CB₁ (Howlett et coll., 2002, Pertwee, 2006). Les récepteurs CB₂, essentiellement localisés sur les cellules immunocompétentes, participent à la libération des cytokines et à la migration des cellules de l'immunité, cependant ce récepteur a aussi été décelé au niveau du SNC sur les cellules microgliales (Pertwee, 2006). Deux nouveaux récepteurs sensibles aux cannabinoïdes ont été mis en évidence, le premier TRPV1 (transient receptor potential vanilloïde 1) qui serait insensible au THC et le GPR55, sensible au THC et insensible au WIN 55,212-2. Ce

dernier est couplé à une protéine-G et partage moins de 20% d'homologie avec CB₁ et CB₂ (Sharir and Abood, 2010). Il a été localisé dans le SNC, au niveau intestinal et osseux.

2.1 Effets du THC

Dans notre étude, les animaux ayant reçu uniquement du THC ont présenté les mêmes symptômes que ceux rapportés dans la littérature (Pertwee, 2006) : hypomobilité (ou hypokinésie), catalepsie, hypothermie (Duarte et coll., 2010). L'antinociception rapportée n'a pas été vérifiée. Ces effets sont dose-dépendants et ainsi plus intenses ou plus fréquents à la dose de 8,4 mg.kg⁻¹. Ils seraient dus à l'action du THC sur les CB₁ (Wiley et coll., 2002, Pertwee, 2006, McMahon and Koek, 2007). Dans le groupe à 3 mg.kg⁻¹, plusieurs animaux se sont redressés ou se sont maintenus contre la sonde en position verticale. Cette observation pourrait ne pas être anecdotique puisqu'une augmentation de l'activité verticale a été observée chez le rat Sprague-Dawley après administration IP de THC. Dans notre étude, ce phénomène intervient à 3 mg.kg⁻¹ alors que dans l'étude rapportée, à cette dose, cet effet a disparu mais leur durée d'observation était quatre fois inférieure à la nôtre (Sanudo-Pena et coll., 2000).

Pour notre étude, nous avons choisi deux doses en fonction de nos précédents résultats (Duarte et coll., 2010), l'une, 3 mg.kg⁻¹, ne provoquant pas d'effet respiratoire significatif et l'autre, 8,4 mg.kg⁻¹, en provoquant. Les résultats de cette présente étude confirment les précédents : les rats du groupe T3 n'ayant pas présenté de variation significative de leur respiration, ceux de T8 ayant respiré plus lentement suite à une augmentation du T_I. Les doses employées sont restées très en deçà de la DL₅₀ à 7 jours (DL_{50/7 j}) établie pour la voie IP chez le rat Holtzman à 373 mg.kg⁻¹ par l'équipe de Forney (Forney, 1971, Phillips et coll., 1971b)

Dans la littérature, peu d'études rapportent les effets respiratoires des cannabinoïdes et plus particulièrement du THC, CB₁ ayant longtemps été considéré comme absent des centres respiratoires (Howlett et coll., 2002). Chez l'homme, les études sont anciennes et les effets

respiratoires semblent plutôt faibles (Weil et coll., 1968, Schwin et coll., 1973, Johnstone et coll., 1975, Malit et coll., 1975, Abboud and Sanders, 1976, Wu et coll., 1992).

Quelques expérimentations plus récentes rapportent des effets respiratoires chez l'animal. En 2003 et 2004, l'équipe de Szabo rapportaient les effets respiratoires d'agonistes des récepteurs CB₁ et CB₂ (WIN55,212-2 et CP55940) chez le rat Wistar anesthésié après administration intraveineuse ou intracisternale. Lors de chacune des études, une bradypnée a été observée accompagnée d'une baisse du V_E ou d'une insuffisance respiratoire, après administration de CP55940, matérialisée par une baisse du pH artériel (< 7,3) et de la PaO₂ (< 80 mm de Hg) et une hausse de la PaCO₂ (> 60 mm de Hg). L'emploi d'un antagoniste spécifique de CB₁ (Rimonabant), d'un antagoniste spécifique des récepteurs aux opioïdes μ , δ et κ (Naloxone) et d'un analogue cannabinoïde inactif (WIN55,212-3) leur a permis d'incriminer plus spécifiquement un récepteur CB₁ central sans pouvoir en préciser la localisation, ni exclure la participation de mécanismes périphériques (Szabo et coll., 2002, Schmid et coll., 2003, Pfitzer et coll., 2004). En 2003, Padley et coll. rapportent après injection de WIN55,212-2 dans le bulbe ventrolatéral rostral (siège du générateur de rythme respiratoire chez les mammifères (Funk and Feldman, 1995, Ramirez and Richter, 1996, Kolesnikova, 2011)) de rats Sprague-Dawley anesthésiés, une excitation du système sympathique, une hypertension et une réduction de la fonction respiratoire jusqu'à l'apnée. Ils ont confirmé la présence de CB₁ dans le bulbe ventrolatéral et plus globalement dans le rhombencéphale, cette zone participant au contrôle de la fonction cardiorespiratoire (centres inspiratoire et expiratoire dans le bulbe rachidien et centres pneumotaxique et apneustique dans le pont de Varole) (Padley et coll., 2003). Plusieurs auteurs avaient, précédemment, rapporté une réduction de la fréquence respiratoire après administration de THC chez le rat ou le chat anesthésiés (Graham and Li, 1973, Li, 1973, Estrada et coll., 1987).

Par contre, chez le singe rhésus, seuls les V_T et V_E sont réduits après administration intramusculaire (IM) de doses croissantes de THC. Les effets du THC étant inhibés par le rimonabant et non par la quadazocine (antagoniste μ , δ et κ), l'activation de CB1 expliquerait les observations (Vivian et coll., 1998). Enfin chez des chats vagotomisés, le THC est rapporté comme induisant plus une réduction de f que de V_T . D'après les auteurs, le ralentissement de la respiration serait dû à une action directe du THC sur le générateur de rythme respiratoire au niveau du bulbe (Doherty et coll., 1983).

A l'exception de l'étude sur les singes, tous les auteurs rapportent chez les animaux tant conscients qu'anesthésiés une bradypnée. Dans notre étude, les rats ayant reçu une dose de $8,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ont respiré plus lentement aussi, ce résultat est cohérent avec les constats précédemment rapportés. Cette bradypnée pourrait avoir comme origine une action inhibitrice du THC *via* un CB₁ sur le centre générateur du rythme respiratoire situé dans la zone ventrolatérale rostrale du bulbe (Tree et coll., 2010). Pour autant, une action périphérique ne peut être tout à fait exclue. Quelques auteurs ont rapporté l'implication possible de récepteurs périphériques aux cannabinoïdes. Ainsi l'action périphérique du THC pourrait expliquer la réduction du nombre d'apnées du sommeil observée chez le rats Sprague-Dawley (Carley et coll., 2002). Enfin, la présence périphérique de récepteurs aux cannabinoïdes : CB₁ (Calignano et coll., 2000) ou CB₂ (Patel et coll., 2003, Cui et coll., 2007) dans les terminaisons axonales de nerfs des voies respiratoires pourraient expliquer les variations de contractilité bronchique après administration de cannabinoïdes.

Par contre, nous n'avons pas observé, lors de cette étude ni lors de la précédente (Duarte et coll., 2010), de variations significatives des volumes respiratoires. Ces différences pourraient s'expliquer en raison des différences de protocole :

- par une susceptibilité différente des espèces ou des souches de rats (singé Rhésus, chats, rats Wistar/Sprague-Dawley) (Howlett et coll., 2002) ;
- par l'état de conscience des animaux (anesthésiés/vigils). Lake et coll. ayant rapporté que l'anesthésie modifiait certains effets cardiovasculaires des cannabinoïdes, en particulier ceux liés au tonus sympathique (Lake et coll., 1997) ;
- par l'évolution de la température corporelle (température maintenue à 37°C/température libre), le THC provoquant une hypothermie à forte dose. Cette variation de température pourrait avoir des conséquences directes ou indirectes sur l'observation de variation de V_T ;
- par les voies d'administrations (intraveineuse/intracisternale/intrabulbaire/intramusculaire/intrapéritonéale) et leur conséquence sur la biodisponibilité du THC (Abel et coll., 1974) mais aussi sur le taux de ses métabolites et en particulier celui de 11-hydroxy-THC (11OHTHC), métabolite actif du THC (Nadulski et coll., 2005).

Les cinétiques sanguines du THC et de ses deux principaux métabolites : le 11-hydroxy-THC et le 11-nor-9-carboxy-THC (THCCOOH), initialement prévues n'ont pas pu être déterminées. Or les variations cinétiques induites par le patrimoine enzymatique des espèces ou le mode d'administration peuvent avoir eu une conséquence sur les effets observés.

Le THC fortement lipophile ($\text{Log } P_{(\text{octanol/eau})} = 7,6$) est métabolisé essentiellement dans le foie, en deux étapes. Dans une première étape de fonctionnalisation (phase I), le THC est hydroxylé par les cytochromes P450 (CYP). Plusieurs composés différents sont formés selon la position de la fonction alcool. Parmi ces métabolites, le 11OHTHC serait le seul à conserver une activité pharmacologique. Ce dernier est formé suite à l'action plus spécifique des cytochromes de la sous-famille CYP2C, chez l'homme, le rat et la souris. Le 11OHTHC est ensuite oxydé en THCCOOH. Le CYP3A4 également actif sur le THC produit d'autres

composés hydroxylés apparemment inactifs. Dans la Phase II, les métabolites hydroxylés sont conjugués à l'acide glucuronique et excrétés par voie biliaire. Dans les intestins, les glucuroconjugués sont hydrolysés, libérant le 11OHTHC et le THCCOOH qui peuvent ainsi être réabsorbés selon un cycle entérohépatique (Narimatsu et coll., 1990, Watanabe et coll., 1993, Huestis, 2007, Watanabe et coll., 2007). Des différences interespèces dans le métabolisme du THC ont été mises en évidence. Ainsi, le cochon d'inde présente un profil métabolique différent de l'homme, alors que le rat et l'homme présentent un profil similaire (Valiveti and Stinchcomb, 2004).

Le métabolisme hépatique du THC est établi comme majoritaire mais d'autres tissus extrahépatiques ont cette capacité. Lors de ce métabolisme extrahépatique, des voies enzymatiques alternatives prédominent et aboutissent à la formation de métabolites soit différents soit en proportions différentes (Huestis, 2007). Ainsi Watanabe et coll. ont rapporté, chez la souris, le rat, le cochon d'inde et le lapin, un métabolisme cérébral du THC, distinct de l'hépatique, qui aboutit à la formation de 4-hydroxy-THC et 5-hydroxy-THC, potentiellement actifs, dans des proportions espèces dépendantes (Watanabe et coll., 1988). Au sein d'une même espèce, Tseng et coll. rapportent une différence de concentration cérébrale en THC entre les mâles et les femelles en rapport avec la masse grasseuse corporelle mais aussi des concentrations différentes de 11OHTHC conséquence d'une différence d'équipement enzymatique (Tseng et coll., 2004).

Au final, le métabolisme spécifique du THC pourrait peut être expliquer les différences observées dans les effets respiratoires :

- lors d'administration intracérébrale. Cette voie d'injection engendrerait des métabolites actifs et spécifiques du cerveau et/ou dans des proportions différentes de celles obtenu après une administration périphérique ;

- lors d'un changement de modèle animal, puisque les équipements enzymatiques et la masse graisseuse diffèrent entre les espèces ;
- lors de la co-administration d'autres substances actives comme les anesthésiques qui pourraient inhiber ou induire une voie enzymatique particulière et modifier les concentrations en substances actives ou interagir aux niveaux des membranes cellulaires.

En raison des faibles volumes de sang prélevables lors de la réalisation d'une étude cinétique chez les petits animaux et des concentrations sanguines relativement faibles (de 0,1 à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$), le dosage du THC et de ses métabolites nécessitent la mise à disposition d'équipement de chromatographie couplée à un spectromètre de masse voire des spectromètres de masse en tandem. Ces équipements sont relativement coûteux. Les études pharmacologiques du THC sont ainsi rarement accompagnées de cinétiques sanguines chez l'animal. La microdialyse cérébrale, qui donne accès aux concentrations locales dans le cerveau, paraît actuellement difficilement envisageable puisque les prélèvements et les concentrations sont encore plus faibles.

Ainsi dans les études rapportées, le plus souvent les dosages sont effectués après sacrifice de l'animal sur le cerveau entier et sur un prélèvement sanguin de volume incompatible avec une cinétique (0,5 à 1 mL). Les cinétiques sont constituées d'un animal par point (Tseng et coll., 2004, Quinn et coll., 2008). Seule l'équipe de Valiveti a rapporté des cinétiques plasmatiques après analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse mais les animaux étaient anesthésiés (Valiveti and Stinchcomb, 2004, Valiveti et coll., 2007).

Pour les études futures concernant les effets des cannabinoïdes et en particulier ceux issus du Cannabis, il apparaît important de disposer des cinétiques sanguines voire cérébrales afin de pouvoir juger et comparer les expérimentations entre elles.

2.2 Effet de l'association de l'éthanol et du THC

Ne pas disposer des cinétiques sanguines du THC et de ces métabolites oblige à prendre quelques précautions quant à l'interprétation des résultats obtenus lors de l'étude de son association à l'éthanol. Si les interactions pharmacocinétiques entre les deux substances pouvaient être attendues, le mode d'administration peut aussi avoir eu des conséquences sans que l'on ait pu les mesurer (Hollister, 1976). En effet, le THC très lipophile est commercialisé sous forme de solution éthanolique à fins d'expérimentation. En vue de son administration, il est dilué dans une solution de chlorure de sodium isotonique additionnée de 5 % de Tween 80. Lors de la co-administration simultanée des doses de THC et d'éthanol, l'alcool présent en grande quantité peut avoir modifié la solubilité et indirectement l'absorption du THC et par conséquent sa biodisponibilité et sa cinétique.

Peu d'études concernant l'influence cinétique de l'administration d'éthanol sur la disponibilité du THC ont été publiées. Dans son chapitre concernant l'interaction entre l'éthanol et le THC, Siemens en rapportent 3 qui concluent à l'absence d'interaction dans l'élimination de l'éthanol par le THC et inversement (Siemens, 1980).

~ ~ 0 ~ ~

L'administration de l'association du THC à 3 et 8,4 mg.kg⁻¹ et de l'éthanol à 1 g.kg⁻¹ a induit une augmentation des effets cliniques observés. A la plus faible dose de THC, les animaux alcoolisés présentaient plus d'incoordination et d'hypomobilité que ceux n'ayant reçu que du THC. A la plus forte dose de THC, certains animaux alcoolisés ont présenté des signes de coma alors qu'aucun coma n'a été observé après l'administration isolée de THC.

Par contre, lorsque le THC est associé à 3 g.kg⁻¹ d'éthanol, les signes cliniques observés sont les mêmes que pour la dose d'éthanol administrée isolément.

Chez le rat Harlan, la durée de sommeil et la durée d'immobilité augmentent après administration IP de doses croissantes de THC associées à 2 ou 3 g.kg⁻¹ d'éthanol, jusqu'à la dose de 10 mg.kg⁻¹ de THC à partir de laquelle un effet plateau apparaît (Forney, 1971, Phillips et coll., 1971a). L'action synergique des substances facilitant la transmission GABAergique (l'éthanol en fait partie) sur la catalepsie induit par le THC a été montrée (Pertwee et coll., 1988). De plus, l'activation des CB1 affecte la transmission *via* les récepteurs NMDA et AMPA (Li et coll., 2010). Cette voie de transmission est aussi affectée par l'éthanol, les deux substances pourraient aussi avoir une action synergique à ce niveau.

D'ailleurs la potentialisation des effets du THC par l'éthanol (et inversement) a déjà été rapportée :

- pour l'incoordination motrice chez la souris CD-1. L'adénosine cérébrale et les récepteurs à l'adénosine A₁ et aux cannabinoïdes CB1 seraient impliqués dans cette synergie (Dar, 2000) ;
- pour les troubles de la mémoire chez le rat « Marchigian Sardinian préférant l'éthanol » (Ciccocioppo et coll., 2002).

Le but de notre étude était l'observation des effets respiratoires, l'étude des signes cliniques n'a pas été optimisée et ne décrit pas suffisamment ceux-ci, en particulier dans leur intensité. Cependant, l'observation d'état comateux lors de l'association des doses de THC à 8,4 mg.kg⁻¹ et d'éthanol à 1 g.kg⁻¹, alors qu'isolément ces doses ne provoquent pas cet effet, est en faveur d'une synergie d'effet.

~ ~ O ~ ~

Le THC et l'éthanol provoquent tous deux, dans nos conditions expérimentales, une hypothermie. Pour toutes les associations étudiées, cette hypothermie provoquée est soit d'intensité soit de durée supérieure à celles éventuellement induites par les substances isolément, ce qui est cohérent avec de précédentes observations (Pryor et coll., 1977) et correspond à un effet synergique. Comme il a été rappelé précédemment, le THC provoque une hypothermie par activation des récepteurs CB1 mais l'intervention d'autres neurotransmetteurs a été mise en évidence. Chez le rat Sprague-Dawley, le récepteur à la dopamine D2, dont les agonistes potentialisent l'hypothermie induite par le THC alors que les antagonistes l'inhibe, serait impliqué (Nava et coll., 2000). Chez le rat Wistar, le système sérotoninergique et plus particulièrement les récepteurs 5-HT_{1A} participeraient à l'hypothermie induite par le THC, particulièrement ceux du noyau raphé médian dont certains neurones se projettent dans l'hypothalamus (Fennessy and Taylor, 1977, 1978, Malone and Taylor, 1998, 2001). L'effet sur la thermorégulation de l'éthanol pouvant provenir aussi de la participation de ces neurotransmetteurs (Kalant and Le, 1983). Un effet synergique à ces niveaux ne peut être exclu d'autant que l'hypothèse la plus récente implique l'action de l'éthanol sur le centre de thermorégulation du noyau préoptique au niveau de l'hypothalamus.

Cependant d'autres hypothèses sont envisageables. Le stress tendant à potentialiser l'hypothermie induite par l'éthanol, les effets psychoactifs du THC, non mesurables dans notre étude, ont pu déclencher ou intensifier l'hypothermie. Enfin, en l'absence des concentrations circulantes, une potentialisation d'origine pharmacocinétique ne peut être exclue.

~ ~ O ~ ~

Au niveau respiratoire, l'association des faibles doses de THC 3 mg.kg^{-1} et d'éthanol 1 g.kg^{-1} a provoqué une augmentation significative de T_I pendant la seconde demi-heure d'expérimentation. L'augmentation du T_I est un effet connu du THC (Duarte et coll., 2010) mais cette augmentation (non significative) est plus tardive lorsque le THC est administré isolément. L'apparition plus précoce d'un effet spécifique du THC est en faveur d'une interaction pharmacocinétique ayant produit une accélération de son absorption. Aucun autre effet respiratoire significatif n'a été mis en évidence pour cette association de faibles doses.

Les associations de l'éthanol à une plus forte dose de THC $8,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ont provoqué plusieurs modifications respiratoires et amènent plusieurs constats.

- 1) Le T_I n'est pas augmenté en présence d'éthanol. Dans ce cas, l'incrimination d'un effet pharmacocinétique est moins évidente, à moins que le T_I ait atteint son maximum. Cette hypothèse est cohérente avec les précédentes observations, les valeurs de T_I mesurées étant similaires aux valeurs des effets maximums rapportées (Duarte et coll., 2010). L'effet cinétique serait alors masqué par un effet plateau.
- 2) Le T_E tend à être plus faible (et conséquemment f à augmenter) lors de l'association à la forte dose d'éthanol. La réduction du T_E est un effet observé de l'éthanol, le THC provoquant une augmentation du T_E mais à des doses supérieures à celles agissant sur le T_I (Duarte et coll., 2010). Cet effet n'étant apparemment ni potentialisé ni antagonisé, son observation est en faveur d'une additivité des effets du THC et de l'éthanol sur le T_E .

- 3) Par contre lors de l'association du THC à $8,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ et de l'éthanol à 3 g.kg^{-1} , V_T et le débit inspiratoire sont diminués. Ces variations sont généralement observées lors de l'obstruction des voies aériennes supérieures. Le rapport T_I/T_{TOT} (ou régime inspiratoire) n'étant pas modifié, V_E tend à être réduit aussi, les paramètres étant liés par la formule suivante :

$$V_E = \frac{V_T}{T_I} \times \frac{T_I}{T_{TOT}} \text{ avec } \frac{V_T}{T_I} \text{ débit inspiratoire moyen (Jordan, 1982, Kirkness et coll., 2006).}$$

Lors d'une réduction du débit inspiratoire, le mécanisme de compensation implique l'augmentation de T_I (et du rapport T_I/T_{TOT}) afin de conserver V_E (Kirkness et coll., 2006). Ce mécanisme compensatoire ne fonctionne pas ici, vraisemblablement en raison de l'action du THC sur T_I , ce dernier est déjà à son maximum et ne peut plus être augmenté.

Les effets de l'éthanol sur la résistance des voies aériennes supérieures sont connus. L'augmentation de cette résistance est à l'origine, pendant le sommeil, des ronflements voire des apnées. L'éthanol agit sur le tonus musculaire du génio-glosse et des muscles de la nuque mais les effets (ronflements, apnées) ne sont observables que pendant le sommeil (Robinson et coll., 1985, Robinson and Zwillich, 1985, Karkoulas et coll., 2008, Vecchio et coll., 2010, Horner, 2011). Paradoxalement, le THC à 10 mg.kg^{-1} réduit le nombre d'apnée chez le rat Sprague-Dawley de 300 à 350 g (Carley et coll., 2002).

L'éthanol pourrait être à l'origine de la diminution du débit inspiratoire par augmentation de la résistance des voies aériennes supérieures mais aucune diminution du débit inspiratoire n'a été mise en évidence ni à la dose de 3 g.kg^{-1} , ni à celle de $4,5 \text{ g.kg}^{-1}$ lors de l'étude des effets respiratoires de l'administration isolée d'éthanol. Seule son association au THC a provoqué cette diminution du débit inspiratoire. La part imputable à chacune des

substances ne peut être discutée à partir de notre modèle animal, mais quelques hypothèses peuvent être émises :

Soit la diminution du débit inspiratoire est due à l'action combinée directe du THC (*via* ses récepteurs sur le centre inspiratoire par exemple) et de l'éthanol (sur le tonus musculaire par exemple) ;

Soit l'une des substances a potentialisé indirectement l'effet de l'autre

- Par l'altération de l'état de conscience (sédation, coma, stress) : l'augmentation de la résistance des voies aériennes supérieures induite par l'éthanol n'ayant de conséquences respiratoires apparentes que lors du sommeil, et le stress étant capable de muer la dépression générale induite par le cannabis en agressivité chez le rat (Carlini et coll., 1976)
- Par les variations cardiocirculatoires qu'elle a ou qu'elles ont engendrées (Kiplinger and Manno, 1971, Manno et coll., 1971),
- Par interaction pharmacocinétique.

La diminution du débit inspiratoire n'étant pas compensée par l'augmentation du T_I , les rats ayant reçu l'association de THC à $8,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ et de l'éthanol à 3 g.kg^{-1} présentent une tendance à la réduction du V_E . Cette réduction est physiologique pendant le sommeil mais en comparaison aux autres groupes, elle est accentuée pour T8E3. Dans une étude future, l'exploration des gaz du sang pour cette association serait importante afin de vérifier les conséquences éventuelles de cette baisse de la ventilation.

2.3 Modèle

Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature d'étude pléthysmographique du THC, en dehors de celle menée précédemment par notre équipe, ni d'étude des effets respiratoires chez le rat de l'association du THC et de l'éthanol. Nos groupes THC ont présentés des effets cohérents avec les précédents résultats, ce qui prouve la robustesse de nos observations.

De l'association du THC et de l'éthanol, seuls les signes cliniques et l'hypothermie ont pu être confrontées à ceux rapportés dans d'autres études publiées. Nos résultats restent cohérents. L'augmentation tant en durée qu'en intensité laisse à penser qu'il existe au moins une additivité des effets voire une synergie entre ces deux substances.

La baisse de la ventilation décelée lors de l'association des substances aux fortes doses semble ne jamais avoir été rapportée. Malheureusement, ni l'étude des cinétiques sanguines ni l'étude des gaz du sang n'ont pu être réalisées. L'absence de ces résultats empêche toute discussion sur l'interaction pharmacocinétique éventuelle et ses conséquences possibles sur la ventilation.

Lors de l'élaboration de ces travaux, nous avons choisi de standardiser les protocoles. Cette standardisation a peut être atteint sa limite dans l'étude de l'association du THC et de l'éthanol. Il conviendrait peut être d'envisager l'administration du THC ou d'un extrait de cannabis par voie IV et l'éthanol par voie IP. La voie IV mime mieux l'inhalation et l'éventuelle interaction liée à l'administration simultanée des deux substances serait évitée.

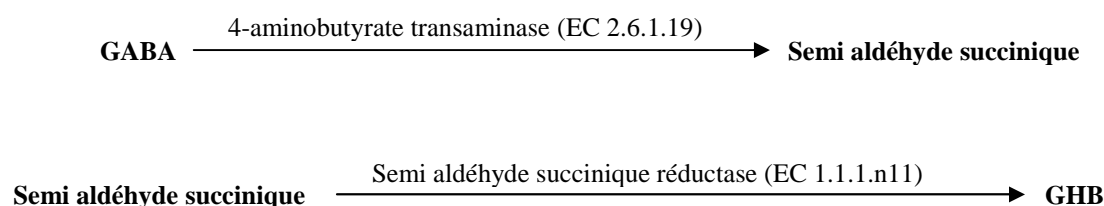
Ce protocole plus contraignant lors d'une étude par pléthysmographie corps entier présenterait moins d'inconvénient que l'inhalation après fumigation. Même si, chez la souris ICR, les effets produits par l'inhalation de fumées de Cannabis sont quantitativement différents de ceux après injection IV, l'effet hypothermique en particulier étant plus modeste après l'inhalation. Cette variation pourrait avoir comme origine l'action d'autres

cannabinoïdes présents dans la fumée mais aussi tous les autres composés non cannabinoïdes produits lors de la combustion des fragments végétaux (Lichtman et coll., 2001).

Aucune bradypnée imputable au THC et aux cannabinoïdes ni aucune hypopnée n'a été rapportée chez l'homme. Bellville et coll. rapportent des effets mineurs du THC sur la respiration (Bellville et coll., 1975), une baisse de la résistance des voies aériennes supérieures a été rapportée après l'inhalation de *Cannabis* (Bernstein et coll., 1976, Lange, 2007, Tetrault et coll., 2007) mais les doses testées sur l'humain sont toujours inférieures et non équivalentes à celles appliquées aux animaux lors des expérimentations. Pour autant, la disponibilité, même restreinte, de formes pharmaceutiques telles que le Marinol® 10 mg et la vente de cannabinoïdes de synthèse potentiellement plus actifs sur les récepteurs aux cannabinoïdes que le THC augmentent le risque d'observer des intoxications chez certains patients ou usagers et des effets respiratoires pourraient être observés.

3 *Acide gamma hydroxybutyrique*

L'acide γ -hydroxybutyrique, aussi dénommé GHB, est un acide gras à chaîne courte, de formule brute $C_4H_8O_3$. Composé endogène, il est produit dans le cerveau des mammifères (Roth et coll., 1966, Roth, 1970) à partir de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), selon l'enchaînement biochimique suivant (Snead et coll., 1989).



Seul 1 à 2% du semi aldéhyde succinique (SSA) est réduit en GHB au niveau du cytosol, l'essentiel étant oxydé dans la mitochondrie en acide succinique qui entre dans le cycle de Krebs. Le GHB peut être produit à partir d'autres substances naturelles : par oxydation en deux étapes du 1,4 butanediol (1,4-BD) ou hydratation de la γ -butyrolactone (GBL) (Snead et coll., 1989, Deveaux, 2002).

Le GHB a longtemps été considéré comme un métabolite du GABA sans activité physiologique propre, bien que ses systèmes de synthèse, de recapture et de stockage, tous inégalement repartis dans le cerveau laissent penser qu'il pouvait avoir un autre rôle (Roth et coll., 1966, Roth, 1970). L'équipe de Maitre ayant mis en évidence l'existence d'un récepteur présynaptique spécifique au GHB (Benavides et coll., 1982a), il est maintenant reconnu comme un neuromédiateur à part entière.

Une étude récente menée sur le cochon d'inde par métabolomique a montré que le GHB pourrait être actif sur au moins trois types de récepteurs : le récepteur spécifique au GHB, certains récepteurs $GABA_A$ et les récepteurs $GABA_B$. Ces propriétés seraient dose-dépendantes, (1) à faible dose, le GHB activerait son récepteur spécifique et/ou un $GABA_A$

particulier (récepteur contenant la sous-unité $\alpha 4$), (2) en augmentant la dose, il active en premier les GABA_B puis (3) à une dose plus conséquente, le récepteur GABA_A- ρ , mais le mécanisme d'activation des GABA_A par le GHB n'est pas encore n'est pas connu (Nasrallah et coll., 2010).

Le récepteur spécifique au GHB est présent dans le cerveau du rat et de l'homme. Il présenterait 7 domaines transmembranaires chez le rat et 6 chez l'homme. Il a une forte affinité pour le GHB, la constante de dissociation (Kd) est respectivement de 426 nM pour le récepteur du rat et 114 nM pour le récepteur humain après transfection sur cellule CHO (Andriamampandry et coll., 2003, Andriamampandry et coll., 2007). Il serait donc sensible aux concentrations synaptiques du GHB et participerait dans des conditions physiologiques à la modulation de la transmission GABAergique. Lors d'apport exogène de GHB, ce récepteur serait rapidement désensibilisé et son activité très réduite. Par conséquent, lors de l'administration de doses thérapeutiques ou récréatives, les effets induits par le GHB seraient essentiellement dus à sa liaison au récepteurs GABAergiques et plus spécifiquement aux GABA_B (Maitre et coll., 2005).

Le GHB est un ligand de faible affinité pour les récepteurs GABA_B, Kd de l'ordre du μ M (Felmlee, 2010). Les GABA_B sont des récepteurs métabotropes, hétérodimériques à 7 domaines transmembranaires, constitués de deux sous-unités GABA_{B1} et GABA_{B2}. L'unité de type GABA_{B1} reconnaît le ligand et l'unité GABA_{B2} active la protéine G couplée. Il existe au moins deux isoformes de GABA_{B1} : GABA_{B1a} et GABA_{B1b}. Les récepteurs composés de l'isoforme B_{1a} sont couplés à une protéine-G_i, leur activation inhibe les canaux calciques et module la libération des neurotransmetteurs. Ceux composés de l'isoforme B_{1b} sont aussi couplés à une protéine-G_i, leur activation active les canaux potassium, inhibe les canaux calciques et entraine une hyperpolarisation du neurone. Le fonctionnement de ces deux récepteurs est assez semblable, les différences pharmacologiques observées après leur

activation sont plus le fait de leur localisation (autorécepteur, hétérorécepteur, présynaptique, post-synaptique, axonale ou dendritique), de l'état de fonctionnement de la protéine-G couplée ou de l'effecteur et de la disponibilité locale du ligand (Marshall et coll., 1999, Ulrich and Bettler, 2007, Pinard et coll., 2010).

Les récepteurs GABA_A ont déjà été présentés dans la partie concernant l'éthanol. Le récepteur GABA_A- ρ , aussi appelé GABA_C, est constitué de 5 sous-unités ρ . Cette sous-unité présente plusieurs isoformes, le récepteur formé peut alors être un homopentamère ou un hétéropentamère. Son activation ouvre le canal chlore ce qui peut aboutir à l'hyperpolarisation du neurone (Bormann, 2000). L'activation des GABA_A directe par le GHB ou indirecte par le GABA produit après administration de GHB n'a pas encore été établie.

L'activité pharmacologique du GHB repose ainsi sur un certain nombre de récepteurs qui lui sont sensibles. Pour autant, comme il est ionisé à pH physiologique ($pK_a = 4,7$), il ne traverse pas librement les membranes, ne se lie pas aux protéines plasmatiques, sa disponibilité locale est influencée par l'existence de transporteurs (Palatini et coll., 1993) et il est présent en plus grande quantité dans le muscle que dans les tissus adipeux (Roth et coll., 1966). Présent sous forme d'anion, le GHB est donc transporté activement à travers les membranes. Ce transport actif a été mis en évidence chez le rat dans les intestins (Arena and Fung, 1980), le tissu cérébral (Benavides et coll., 1982b), la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Bhattacharya and Boje, 2004) et dans les tubules rénaux proximaux (Wang et coll., 2006). L'action des transporteurs *monocarboxylate transporter* : MCT1, MCT2, MCT4 et *sodium-monocarboxylate transporter* : SMCT1 a clairement été établi pour le transport du GHB (Wang et coll., 2007, Wang and Morris, 2007b, Cui and Morris, 2009), SMCT2 pourrait aussi être impliqué (**Tableau 22**).

Tableau 22 : Comparaison de substrats et d'inhibiteurs pour les MCT et SMCT de rat (Halestrap and Meredith, 2004, Martin et coll., 2006, Wang et coll., 2006, Morris and Felmllee, 2008, Cui and Morris, 2009)

Protéine	Localisation	Substrat	Km (mM)	Inhibiteur	CI ₅₀ (μM)
MCT1	Ubiquitaire	Lactate	3,5	Phlorétine	28
		Pyruvate	1,0	Quercétine	14
		GHB	4,6	CHC	425
MCT2	Foie, rein, thyroïde, cerveau, spermatozoïdes, testicules	Lactate	4,6	Phlorétine	14
		Pyruvate	0,74	Quercétine	5
		GHB	NA	CHC	24
MCT4	Cœur, muscle squelettique	L-Lactate	34	CHC	350
		Pyruvate	36,3		
		GHB	NA		
SMCT1	Rein, thyroïde, cerveau	Lactate	NA	Fenoprofène	NA
		Pyruvate	NA	Ibuprofène	NA
		Acetate	NA	Kétoprofène	NA
		GHB	0,68		
SMCT2	Rein	Lactate	NA		
		Pyruvate	NA		
		Acetate	NA		

CHC α -cyano-4-hydroxycinnamate

NA : non apprécié

CI₅₀ : concentration inhibitrice médiane

Les quatorze transporteurs de la famille des MCTs comportent tous douze domaines transmembranaires, les parties N- et C-terminales étant localisées dans le cytoplasme. Leur spécificité de substrat serait due aux variations de séquences sur la boucle intracellulaire (entre les domaines 6 et 7) et la partie C-terminale. Les domaines transmembranaires sont conservés, ainsi, par exemple, MCT2 et MCT1 ont 60% de leur structure en commun. Les MCT1, MCT2 et MCT4 capables de transporter le GHB, cotransportent l'anion avec un proton (H^+), le processus est électriquement neutre et couplé au gradient transmembranaire de H^+ (Halestrap and Meredith, 2004, Morris and Felmlee, 2008).

D'un fonctionnement différent, les transporteurs de la famille SMCT ont une spécificité de substrat similaire à ceux de la famille MCT. Actuellement seuls deux membres de la famille des SMCT ont été clonés : SMCT1 et SMCT2. Ces protéines comportent 13 domaines transmembranaires. Elles cotransporteraient un anion carboxylate et 1 à 4 cations sodium (Na^+), le processus étant électrogénique (Martin et coll., 2006, Cui and Morris, 2009).

Ces transporteurs participent aux influx et efflux cellulaires de monocarboxylates, selon leur type, leur affinité et leur localisation. Ils modulent ainsi l'absorption, la distribution et l'élimination du GHB et influencent conséquemment la pharmacocinétique de celui-ci.

3.1 Cinétiques sanguines du GHB

Toutes les doses testées sont inférieures, au maximum à 73 %, à la $DL_{50/14j}$ déterminée à $2,2 \text{ g.kg}^{-1}$ par la méthode « up-and-down ». Cette valeur est cohérente avec celle rapportée par Laborit chez le rat à $1,7 \text{ g.kg}^{-1}$, les rats décédant d'une dépression respiratoire.

~ ~ 0 ~ ~

Le premier objectif de la détermination des concentrations sanguines du GHB après administration IP était de vérifier l'adéquation des doses aux concentrations sanguines

humaines observées lors de l'usage thérapeutique ou récréatif du GHB, voire lors d'intoxications létales. Les C_{max} artérielles mesurées pour les doses IP de 100 à 1000 mg.kg⁻¹ sont comprises entre 60 et 880 mg.L⁻¹. Elles correspondent aux concentrations sanguines de GHB associées à des intoxications humaines, rapportées entre 30 et plus de 2000 mg.L⁻¹ (Caldicott et coll., 2004, Couper et coll., 2004, Knudsen et coll., 2010, Kugelberg et coll., 2010). Des cas de conducteurs automobile ou de consommateurs ont aussi été rapportés à plus de 300 voire 400 mg.L⁻¹ (Jones et coll., 2007, Kugelberg et coll., 2010). A titre de comparaison, les concentrations sanguines de GHB endogène ont été déterminées chez 55 volontaires entre de 0,9 à 3,5 mg.L⁻¹ (Yeatman and Reid, 2003).

~ ~ o ~ ~

Suite à l'étude sur 4 heures des concentrations sanguines du GHB, le modèle cinétique validé lors de la modélisation est à un compartiment avec absorption d'ordre 1 et élimination non linéaire de type Mickaelis-Menten. Ce modèle corrobore les constats établis lors de l'analyse non compartimentale :

- les concentrations sanguines en GHB augmentent avec la dose (C_{max} et AUC_{0→240}) ;
- CL/F_{IP} décroît avec la dose ce qui est en faveur d'une élimination non linéaire ;
- l'absorption tend à augmenter avec la dose, l'absorption peut être d'ordre 1.

Par contre, nous n'avons pas trouvé dans la littérature de modélisation de population concernant les concentrations sanguines de GHB chez le rat après administration IP. Seule une étude des conséquences cinétiques de l'interaction du 1,4-BD et de l'éthanol a été rapportée. Fung et coll. proposent une modélisation selon une approche par population mais les valeurs validées pour le GHB administré isolément ne sont pas rapportées et ne peuvent donc pas être comparées aux nôtres (Fung et coll., 2008). Nos données sont alors comparées à celles rapportées lors d'études cinétiques plus classiques.

Absorption – Distribution

Aucun article rapportant la cinétique sanguine du GHB après administration IP chez le rat n'ayant été trouvé dans la littérature, la cohérence des valeurs déterminées est difficile à vérifier. Seules quelques études rapportent des cinétiques plasmatiques après des administrations autres qu'intraveineuse. Après administration orale chez le rat mâle Sprague-Dawley pesant de 260 à 340 g, les Tmax observés croissent avec la dose (Lettieri and Fung, 1979). Après administration sous-cutanée d'une dose de 548 mg.kg⁻¹ de GHB chez le rat mâle Sprague-Dawley de 275 à 300 g, le Tmax observé est de 50 min, notre estimation du ka est cohérente puisque supérieur à celle rapportée (Raybon and Boje, 2007).

L'absorption et la distribution du GHB sont régies par son transport actif *via* certains MCTs et SMCTs. Ce transport a été modélisé et rapporté comme suivant une cinétique non linéaire (Felmlee et coll., 2010b, Lam et coll., 2010, Morse et coll., 2012a, Roiko et coll., 2012). Ainsi après administration IV, le Tmax plasmatique du GHB est de 5 min alors que son Tmax cérébral est de 50 min (Roiko et coll., 2012) ; après administration *per os* le Tmax plasmatique est de 50 min alors que le Tmax cérébral est de 120 min (Raybon and Boje, 2007). Ce délai de distribution a été mis en évidence dans l'étude des effets du GHB sur l'électroencéphalogramme (EEG) du rat mâle Wistar de 280 à 420 g par la présence d'un hystéresis entre l'EEG et les concentrations plasmatiques (Van Sassenbroeck et coll., 2001).

Enfin, ces études rapportent des modélisations à deux compartiments ou plus, en considérant soit le cerveau (Raybon and Boje, 2007, Roiko et coll., 2012), soit le rein (Felmlee et coll., 2010b), mais notre protocole optimisé pour la pléthysmographie et les données obtenues ne nous ont pas permis d'envisager ce type de modélisation.

Métabolisme et élimination

A faible dose, le GHB est principalement éliminé par métabolisation (plus de 90 %), par voie urinaire sous forme inchangé (5 à 7 %) et voie biliaire (2%) (Lettieri and Fung, 1976, Morris et coll., 2005).

Chez le rat, le métabolisme du GHB s'effectue dans tout l'animal. Il est très rapide, après une administration intraveineuse de GHB marqué au carbone 14 sur sa fonction carboxyl, du dioxyde de carbone 14 est décelé dans la respiration au bout de 4 min, 60% de la dose étant éliminé dans l'air expiré en moins de 150 min (Roth et coll., 1966). Dans une étude récente, Zhang et coll. ont confirmé, par métabolomique, que le catabolisme du GHB dans le foie de rats Sprague-Dawley à jeun de la veille suivait 3 voies distinctes (Zhang et coll., 2012).

(1) Le GHB est oxydé en position γ en SSA puis en succinate, celui-ci rentre alors dans le cycle de Krebs. Deux systèmes enzymatiques distincts participent à cette réaction.

- Le premier est cytosolique, il comprend la *4-hydroxybutyrate dehydrogenase* (EC 1.1.1.61 ou 4-hydroxybutanoate: NAD⁺ oxidoreductase) et la *succinate-semialdehyde dehydrogenase* (EC 1.2.1.16 / EC 1.2.1.24 / EC 1.2.1.79 ou succinate-semialdehyde: NAD(P)⁺ oxidoreductase). Ce système peut être couplé à la *glucuronate reductase* (EC 1.1.1.19 ou L-gluconate: NADP⁺ 6-oxidoreductase) ce qui a pour conséquence de maintenir le taux de cofacteur (Kaufman and Nelson, 1991). Ce système enzymatique a été mis en évidence dans le foie du hamster (Kaufman and Nelson, 1981), dans le cerveau, le rein et le muscle de rat (Kaufman and Nelson, 1987).
- Le second système est mitochondrial, il nécessite la présence d'un accepteur de H⁺ : *hydroxyacide-oxoacide transhydrogenase* (EC 1.1.99.24 ou (S)-3-hydroxybutanoate:

2-oxoglutarate oxidoreductase). Cette enzyme a été mise en évidence dans le foie, le rein et le cerveau du rat (Kaufman and Nelson, 1991).

L'étude du catabolisme du GHB marqué a montré la formation, entre autre, de GABA, glutamate et glycine marqués. Ces trois neuromédiateurs sont produits en raison de l'incorporation des métabolites du GHB dans le cycle de Krebs et de l'existence des shunts du GABA et du glyoxylate. Le GABA peut provenir aussi de la transformation du SSA en raison de la réversibilité de la 4-aminobutyrate transaminase (Hechler et coll., 1997, Gobaille et coll., 1999, Zhang et coll., 2012).

(2) Le GHB est oxydé en position β ce qui aboutit à la formation de glycolyl-CoA, d'acétyl-CoA, de 3-hydroxypropionyl-CoA, de CO_2 et d'ion formiate (Zhang et coll., 2012).

(3) Le GHB est oxydé en position α ce aboutit à la formation de 3-hydroxypropionyl-CoA et d'ion formiate (Zhang et coll., 2012).

Comme les monocarboxylates endogènes à courte chaîne carbonée, le GHB est filtré par le glomérule rénal et réabsorbé au niveau du tubule proximal par des transporteurs des familles MCT et SMCT. Ces mécanismes sont saturables ainsi lors de l'administration exogène de GHB, l'élimination rénale croît avec la dose, sa part relative par rapport à la clairance totale passe de 3 % pour une concentration plasmatique à l'équilibre de 220 mg.L^{-1} à 32 % pour 680 mg.L^{-1} (Morris et coll., 2005).

L'élimination du GHB est donc le fait de plusieurs processus saturables : une clairance métabolique et une réabsorption rénale, toutes deux à capacité limitée, ainsi la clairance du GHB est dose-dépendante et sa cinétique est non-linéaire (Lettieri and Fung, 1978, Lettieri and Fung, 1979, Felmler et coll., 2010b).

Quelques études présentent des estimations de V_{\max} et de K_m auxquelles les nôtres peuvent être comparées. Morris et coll. rapportent, chez le rat Sprague-Dawley mâle de 260 à 350 g après administration IV, une élimination non-linéaire de type Mickaelis-Menten avec $V_{\max} = 2,3 \pm 0,3 \text{ mg.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ et $K_m = 0,063 \pm 0,047 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Morris et coll., 2005). Lettieri and Fung, avec un modèle animal similaire, rapportent un V_{\max} de $7,1 \pm 1,2 \text{ mg.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ et un $K_m = 0,338 \pm 0,134 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Lettieri and Fung, 1979). Avec une souche différente de rats, Van Sassenbroeck et coll. rapportent chez le rat Wistar mâle de 250 à 480 g après une administration intraveineuse de 390 mg.kg⁻¹, une élimination non-linéaire de type Mickaelis-Menten avec $V_{\max} = 2,5 \pm 0,5 \text{ mg.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ et $K_m = 0,060 \pm 0,055 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Van Sassenbroeck et coll., 2002) et après une administration intraveineuse de 400 mg.kg⁻¹, une élimination non-linéaire de type Mickaelis-Menten avec $V_{\max} = 3,4 \pm 0,2 \text{ mg.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ et $K_m = 0,075 \pm 0,012 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Van Sassenbroeck et coll., 2003). Notre étude nous a permis d'estimer des valeurs comparables : $V_{\max} = 3,1 \pm 0,4 \text{ mg.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ et $K_m = 0,071 \pm 0,016 \text{ mg.mL}^{-1}$. Seules les valeurs de Lettieri et Fung se distinguent des autres.

Ainsi, bien que l'influence du transport actif du GHB n'ait pas été considérée sous une forme particulière lors de notre modélisation, nos estimations corroborent celles rapportées et le modèle validé est satisfaisant. Il pourra servir de base à la construction de modèles plus élaborés qui intégreraient d'autres compartiments comme le cerveau, le foie et le rein. En effet la diversité des transporteurs et des récepteurs sensibles au GHB nécessite la connaissance de la disponibilité locale de celui-ci, surtout aux vues des effets observés.

3.2 Effets du GHB

Le GHB est sédatif. Cet effet, mis à profit pour son emploi comme anesthésique, est rapporté aussi chez les rongeurs. Il est dose-dépendant et aboutit à fortes doses au coma (Lettieri and Fung, 1979, Carai et coll., 2001, van Nieuwenhuijzen and McGregor, 2009,

Koek et coll., 2010). Dans des études sur le rat mâle Sprague-Dawley de 275 à 320 g, la relation entre les effets sédatifs du GHB et les concentrations plasmatiques et cérébrales est rapportée (Raybon and Boje, 2007, Felmlee et coll., 2010a). L'augmentation avec la dose des effets sur la conscience observée dans notre étude est alors cohérente. Le mécanisme de cette dépression centrale reste encore discuté. Une majorité d'auteurs relatent un effet du GHB sur la transmission GABAergique *via* le GABA_B. Cette activation du récepteur GABA_B a été incriminée :

- chez la souris mâle DBA de 25 à 30 g (Carai et coll., 2001, Castelli et coll., 2003) ;
- chez le rat mâle Sprague-Dawley de 200 à 250 g (Castelli et coll., 2003) ;
- chez la souris mâle BALB/c de 23 à 26 g (Kaupmann et coll., 2003)
- chez le rat mâle Wistar de 300 g (van Nieuwenhuijzen and McGregor, 2009) ;
- ou chez la souris mâle C57BJ/6J de 26 à 37 g (Koek et coll., 2010).

~ ~ 0 ~ ~

L'effet sédatif du GHB est souvent rapporté associé à un effet hypothermisant mais l'effet sur la température corporelle que nous avons observé est plus complexe qu'une simple hypothermie. La majorité des auteurs rapportent une hypothermie dose-dépendante pour le GHB chez les rongeurs : chez le rat mâle Sprague-Dawley de 250 à 300 g (Lin et coll., 1979), de 300 à 400 g (Kaufman et coll., 1990), chez la souris C57B16/129Sv sauvage (Queva et coll., 2003), chez la souris mâle BALB/c de 3 à 5 mois (Meerlo et coll., 2004, Jacobson et coll., 2006), chez la souris mâle C57BL/6J de 26 à 37 g (Koek et coll., 2010). Quelques auteurs rapportent par contre, lors de l'administration de fortes doses de GHB, une évolution triphasique de la température corporelle : hypothermie, hyperthermie et hypothermie, comme celle que nous avons observée : chez le rat mâle après administration de GBL à 400 mg.kg⁻¹

(Borbely and Huston, 1972) et chez le rat Wistar de 300 g après administration de GHB de 250 à 1000 mg.kg⁻¹ (van Nieuwenhuijzen and McGregor, 2009).

Seuls Lin et coll. et Kaufman et coll. ont rapporté une hypothermie isolée chez le rat (Lin et coll., 1979, Kaufman et coll., 1990), les autres études rapportant cet effet chez la souris. La différence interespèces pourrait expliquer l'absence d'hyperthermie transitoire chez la souris.

Plusieurs raisons peuvent justifier la discordance entre les résultats des études chez le rat. (1) Les équipes rapportant un effet hypothermique isolé ont toutes utilisé des sondes rectales, celles rapportant un effet triphasique avec une hyperthermie intermédiaire et transitoire ont toutes employé des sondes de télémétrie implantées dans l'abdomen des animaux. (2) Seule l'équipe de van Nieuwenhuijzen et la nôtre avons testé des doses supérieures à 750 mg.kg⁻¹ par voie IP (van Nieuwenhuijzen and McGregor, 2009), et nous n'observons d'ailleurs cet effet qu'à partir de la dose de 600 mg.kg⁻¹. En augmentant les doses testées, Kaufman et coll. qui ont étudié l'effet du GHB jusqu'à 500 mg.kg⁻¹, auraient peut être observé cette évolution triphasique de la température (Kaufman et coll., 1990). A l'exception de la dose à 300 mg.kg⁻¹, Lin et coll. ne rapportent que les réductions moyennes observées sans préciser ni le mode de calcul, ni la fréquence des relevés températures utilisées pour celui-ci, si nous avons utilisé ce type de calcul à 240 min, nous aurions rapporté alors qu'une hypothermie dose-dépendante, comme eux (Lin et coll., 1979).

De leur côté, Borbely et coll. observent une évolution triphasique de la température après une administration IP de 400 mg.kg⁻¹ de GBL (Borbely and Huston, 1972). La dose équimolaire de GHB est de 483 mg.kg⁻¹, donc insuffisante à déclencher l'évolution triphasique. Mais le GBL, substance non ionisée à pH physiologique, présente des cinétiques d'absorption et de distribution différentes du GHB et nécessite d'être transformé en ce dernier

pour être actif. Ces variations pharmacocinétiques pourraient être à l'origine d'une disponibilité différente à l'origine de l'observation de l'effet thermique à « moindre dose ».

Au cours de leur étude, van Nieuwenhuijzen et coll. ont tenté d'antagoniser l'effet thermique de la dose de 1000 mg.kg^{-1} de GHB en employant un antagoniste GABA_B : le SCH 50911, un antagoniste des benzodiazépines : le flumazénil, un antagoniste des opioïdes : la naltrexone, un antagoniste des récepteurs D1 à la dopamine : le SCH 23390 et un antagoniste des récepteurs $5\text{HT}_{2A/2C}$ à la sérotonine. Seul le SCH 50911 a réduit la durée de sédation et bloqué l'hyperthermie transitoire sans réduire l'hypothermie (van Nieuwenhuijzen and McGregor, 2009). Cette observation est en faveur d'une participation des récepteurs GABA_B à l'hyperthermie transitoire déclenchée par des doses supérieures à 600 mg.kg^{-1} de GHB.

Par contre, la participation de GABA_B à l'hypothermie est discutée. Chez le rat mâle Wistar, van Nieuwenhuijzen et coll. observent une hypothermie plus marquée en présence d'antagoniste des GABA_B (van Nieuwenhuijzen and McGregor, 2009). Avec des souris mutées n'exprimant pas GABA_{B1} et ne disposant pas par conséquent de récepteur GABA_B fonctionnel, soit le GHB ne provoque pas d'hypothermie (Kaupmann et coll., 2003, Queva et coll., 2003) soit l'hypothermie est moins marquée (Jacobson et coll., 2006). L'implication de GABA_B dans l'hypothermie provoquée par le GHB reste à explorer. Des essais d'antagonisme par le NCS-382, antagoniste spécifique du récepteur au GHB, et par des antagonistes des GABA_A , pourraient compléter ses études et infirmer ou confirmer l'implication de ses systèmes dans les effets du GHB sur la température corporelle.

~ ~ 0 ~ ~

Seuls les animaux des groupes ayant présenté une évolution triphasique de leur température corporelle : de 600 à 1600 mg.kg^{-1} , ont montré des variations significatives du rythme respiratoire sans modification conséquente de V_E . En effet, même si ponctuellement,

les groupes à 1600 mg.kg^{-1} et 600 mg.kg^{-1} ont présenté des V_E respectivement significativement inférieure ou supérieure aux témoins, ces variations sont restées dans l'intervalle des valeurs des témoins au cours de l'expérimentation. Le V_E a été conservé à toutes les doses de GHB.

De manière dose-dépendante, aucun animal des groupes GHB n'a présenté d'augmentation du débit respiratoire à 10 min. Soit cet effet a été masqué par les modifications respiratoires précoces induites par le GHB, soit l'effet sédatif du GHB a rapidement calmé les animaux. Enfin, le débit inspiratoire des animaux du groupe 1600 mg.kg^{-1} est transitoirement diminué de 150 à 180 min, cette diminution est associée à une réduction transitoire et non significative de V_E .

Le rythme respiratoire a donc été significativement altéré par l'administration de GHB. Avec des modèles animaux similaires au nôtre, des baisses de f consécutives à l'administration de GHB ont déjà été rapportées dans la littérature, soit isolément chez le rat mâle Sprague-Dawley (Bania and Chu, 2005), soit avec conservation du V_E chez le rat mâle Sprague-Dawley de 270 à 330 g (Morse et coll., 2012b). Dans cette dernière étude, l'activité d'antagonistes des récepteurs GABA_B : SCH 50911 et des récepteurs GABA_A : bicuculline a été testée sur cet effet. Seul le SCH 50911 inhibe les effets respiratoires du GHB incriminant le GABA_B dans cette activité respiratoire (Morse et coll., 2012b).

L'emploi d'un pléthysmographe barométrique nous permet de détailler les effets sur le rythme respiratoire en termes de variations de T_I et T_E . L'étude des tracés pléthysmographiques révèle l'apparition d'une respiration de type apneustique après administration de GHB à des doses supérieures à 600 mg.kg^{-1} . La respiration apneustique se caractérise par un accroissement de l'activité inspiratoire avec une pause de fin d'inspiration (St-John and Paton, 2000). Seuls Tarakanov et coll. ont rapporté chez le chat anesthésié l'effet

apneustique de l'administration IV de 200 mg.kg⁻¹ d'hydroxybutyrate de sodium (Tarakanov et coll., 1992, Tarakanov et coll., 1993, articles en russe avec résumé en anglais cités par Kolesnikova, 2011). Deux autres équipes ont rapporté une respiration apneustique chez le chat décérébré, anesthésié et vagotomisé après administration de baclofène, agoniste GABA_B (Taveira da Silva et coll., 1987, Pierrefiche et coll., 1993). Cet effet du baclofène sur le T_I avait déjà été rapporté chez le chat anesthésié sans qu'il soit fait mention de respiration apneustique (Lalley, 1983, 1986). Dans notre étude, la pause, que nous avons nommée apnée, a été observée en fin d'inspiration mais aussi en fin d'expiration.

Cet allongement du T_I est contemporain de celui du T_E, mais des variations cinétiques observées tant sur les tracés pléthysmographiques : réduction de l'apnée inspiratoire alors que l'apnée expiratoire persiste ; que sur les tracés cinétiques : augmentation rapide de T_I dès 10 min avec un plateau entre 30 et 90 min alors que l'augmentation de T_E est plus progressive de 20 min à 90 min, nous ont incités à décomposer les respirations en quatre composantes : T_{IC}, A_I, T_{EC} et A_E. L'étude de ces composantes confirme une différence cinétique des phases inspiratoire et expiratoire :

- La phase inspiratoire corrigée (T_{IC}) croît avec la dose pour atteindre un maximum vers 0,4 s. De 600 à 1600 mg.kg⁻¹, le T_{IC} se maintient à ce maximum pendant une durée proportionnelle à la dose et les A_I apparaissent lors de ce plateau, traduisant vraisemblablement l'augmentation de la durée de l'influx nerveux déclenchant l'inspiration ;
- La phase expiratoire corrigée (T_{EC}) présente une cinétique distincte. Le groupe 100 mg.kg⁻¹ expire plus rapidement lors de la première heure et T_{EC} croît avec la dose jusqu'à un maximum d'environ 0,5 s. Il présente un T_{max} vers 30 min, puis décroît progressivement. Aucun groupe ne présente de différence significative de T_{EC} après

120 min alors que T_{IC} reste significativement supérieur pour la dose de 1600 mg.kg^{-1} jusqu'à 240 min. A la différence du T_{IC} , l'aire sous la courbe du T_{EC} présente un maximum atteint vers 1000 mg.kg^{-1} , les cinétiques des groupes 1000 et 1600 mg.kg^{-1} étant superposées. Enfin, les A_E maximales ne sont contemporaines ni des T_{EC} maximaux, ni des A_I maximales : T_{max} des A_E vers 90 min, T_{max} des T_{EC} vers 30 min et T_{max} des A_I vers 40 min.

La disparition complète de la bradypnée induite par le GHB lors du prétraitement par le SCH 50911 (Morse et coll., 2012b) et la contemporanéité de l'allongement de T_I et T_E incriminent le GHB quant à leur déclenchement mais les différences de cinétiques dans ces deux effets sont en faveur de l'existence de mécanismes distincts.

L'allongement du T_I et du T_E a déjà été rapporté chez le rat mâle Sprague-Dawley de 250 à 350 g anesthésié et vagotomisé après lésion du pont de varole (Morrison et coll., 1994). Pour leur part, Jodkowski et coll. ne l'ont observé, avec un modèle animal similaire, qu'après lésion du pont de Varole et administration de glutamate (Jodkowski et coll., 1997), sans le glutamate seul le T_I était modifié (Jodkowski et coll., 1994).

Dans notre étude, les rats ne sont ni anesthésiés, ni réchauffés, ni vagotomisés. Ces trois conditions ont pu influencer les paramètres respiratoires, en particulier le nerf vague dont l'influence sur la respiration n'a pas été abolie. Il a pu participer à l'augmentation du T_E et à la conservation du V_E (Gromysz et coll., 1980).

En conjuguant nos résultats avec ceux rapportés, l'hypothèse d'un effet apneustique du GHB *via* un récepteur $GABA_B$ au niveau des centres respiratoires pontiques ou entre les centres pontiques et médullaires peut être émise mais elle doit être vérifiée à partir d'autres modèles, par exemple : par la mesure de l'activité du nerf phrénique chez le rat anesthésié, vagotomisé après administration de 1000 mg.kg^{-1} IP de GHB. La vagotomie infirmera ou

confirmera alors la participation du nerf vague à l'allongement du T_E après administration de GHB.

Lors de l'épreuve d'hypercapnie exogène intermittente après l'administration de 300 mg.kg^{-1} de GHB, le T_I a été significativement augmenté. Cette augmentation observée tant lors de la ventilation de repos que lors de l'hypercapnie exogène est restée proportionnée. Ainsi entre la respiration de repos et l'hypercapnie exogène, la variation de T_I du groupe GHB n'est pas différente de celle des témoins. Le V_E du groupe GHB a été préservé pendant l'hypercapnie, les modifications de V_T , T_E et T_I/T_{TOT} traduisant vraisemblablement un phénomène d'adaptation alors que T_I est « pharmacologiquement » augmenté. Ce résultat est cohérent avec la préservation du fonctionnement des chémorécepteurs lors de l'administration de baclofène chez le chat (Taveira da Silva et coll., 1987, Pierrefiche et coll., 1993).

~ ~ 0 ~ ~

Le GHB a induit des variations du rythme respiratoire tout en conservant V_E , conséquemment il n'a pas été mis en évidence d'altération d'origine respiratoire des gaz du sang. Seule une alcalose métabolique accompagnée d'une augmentation des bicarbonates a été décelée. L'alcalose métabolique induite par le GHB a déjà été rapportée chez le rat mâle Wistar de 280 à 450 g. Elle serait due au métabolisme du GHB qui aboutit à l'incorporation de succinate au cycle de Krebs et à la consommation de deux H^+ par molécule de GHB (Van Sassenbroeck et coll., 2002).

3.3 Modèle

L'étude des cinétiques sanguines artérielles et des effets respiratoires du GHB chez le rat mâle Sprague-Dawley âgé de 7 à 9 semaines après administration par voie IP a mis en évidence :

- une cinétique non linéaire, qu'il a été possible de modéliser avec une approche en population selon un modèle à un compartiment avec absorption d'ordre un et élimination de type Michaelis-Menten. La cinétique du GHB est influencée par de nombreux mécanismes dont les principaux sont : (1) le transport transmembranaire du GHB par l'intermédiaire d'au moins deux familles de transporteurs : MCT et SMCT qui participent à l'absorption, la distribution et l'élimination du GHB ; et (2) le métabolisme du GHB selon au moins trois voies distinctes : α -, β - et γ -oxydation. Tous ces mécanismes sont saturables ce qui contribue à la non linéarité des cinétiques de GHB ;
- des effets sur la température corporelle. Dans nos conditions expérimentales, où la température ambiante est inférieure à la température corporelle, le GHB à des doses supérieures à 300 mg.kg^{-1} a provoqué une évolution triphasique de la température corporelle des rats : hypothermie-hyperthermie-hypothermie. Si l'hyperthermie transitoire semble due à l'activation des récepteurs GABA_B par le GHB, l'hypothermie (ou les hypothermies) reste insensible à l'antagonisme des GABA_B (van Nieuwenhuijzen and McGregor, 2009). Dans des études récentes, le GHB à des doses supraphysiologiques semble activer d'autres récepteurs comme le récepteur spécifique au GHB et certains GABA_A , l'hypothermie pourrait résulter alors de l'action directe ou indirecte du GHB sur ces récepteurs ;
- des effets sur le rythme respiratoire. Aux mêmes doses que celles ayant provoqué l'évolution triphasique de la température corporelle, le GHB a provoqué une respiration de type apneustique. Cet effet pourrait être dû, lui aussi, à l'activation de récepteurs GABA_B et ses conséquences sur les centres respiratoires, ce qui expliquerait l'observation contemporaine des effets respiratoires et thermiques. Bien que provoquant une respiration de type apneustique, l'administration du GHB n'a

modifié le V_E ni en ventilation de repos ni en hypercapnie exogène aigue. Le GHB ne semble pas altérer les mécanismes de compensation. La ventilation étant conservée, les modifications du rythme respiratoire n'ont pas provoqué d'altération des gaz du sang, l'alcalose rapportée étant d'origine métabolique.

La transposition des effets observés chez le rat à l'homme reste délicate mais les enzymes, les transporteurs et les récepteurs participant aux effets du GHB chez le rat sont présents chez l'homme. En effet, les équipements enzymatiques nécessaires à la synthèse et au catabolisme du GHB ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces de mammifères dont l'homme (Maitre, 1997). Les transporteurs des familles MCT et SMCT sont présents chez l'homme et la participation des MCT 1 à 4 humains au transport du GHB au niveau de l'intestin, du rein et de la BHE a été établie (Bhattacharya and Boje, 2006, Wang et coll., 2007, Wang and Morris, 2007b, Morris and Felmler, 2008, Lam et coll., 2010) (**Tableau 23 & Tableau 24**). L'existence de récepteurs GABA_A et GABA_B (Young and Chu, 1990) et du récepteur au GHB (Andriamampandry et coll., 2007) humains est avérée et ces récepteurs montrent des similitudes avec ceux des rats dans leur fonctionnement et dans leurs agonismes et antagonismes (Johnston, 1996, Bowery et coll., 2002, Andriamampandry et coll., 2007).

De plus, l'administration de GHB à des fins thérapeutiques, récréatives ou d'essai clinique a permis l'observation d'un certain nombre d'effets similaires à ceux observés avec notre modèle. Les cinétiques sanguines du GHB sont non linéaires chez l'homme avec une absorption et une élimination à capacité limitée (Pol et coll., 1975, Lettieri and Fung, 1979, Arena and Fung, 1980, Ferrara et coll., 1992, Palatini et coll., 1993, Scharf et coll., 1998, Abanades et coll., 2006, Jones et coll., 2009). A des doses thérapeutiques, moins de 2% de la dose sont éliminés sous forme inchangée dans les urines humaines (Ferrara et coll., 1996, Abanades et coll., 2006). Enfin, les effets toxiques du GHB observés lors de l'admission en

milieu hospitalier consistent principalement en une dépression du CNS et de la respiration et une hypothermie, les effets cardiovasculaires et digestifs étant moindres (Okun et coll., 2001, Mason and Kerns, 2002, Miro et coll., 2002, Caldicott et coll., 2004, Liechti and Kupferschmidt, 2004, Liechti et coll., 2006). Une augmentation de la température cutanée a aussi été observée dans la première heure suivant l'administration (Thai et coll., 2006). Des alcaloses métaboliques ont été observées chez des patients sédatisés au GHB (Van Sassenbroeck et coll., 2002).

Notre modèle animal d'étude des effets du GHB présente donc des similitudes avec l'homme et paraît intéressant pour la compréhension des mécanismes toxiques du GHB. Il a d'ailleurs été utilisé afin de modéliser le transport transmembranaire du GHB et de tester l'inhibition de sa recapture rénale afin d'augmenter son élimination (Morris et coll., 2005, Wang et coll., 2006, Wang and Morris, 2007a, Wang et coll., 2008a, Wang et coll., 2008b, Felmler et coll., 2010a, Felmler et coll., 2010b, Morse et coll., 2012a, Morse et coll., 2012b, Roiko et coll., 2012). Cette nouvelle approche, qui consiste en l'emploi de lactates rentrant en compétition avec le GHB au niveau des transporteurs rénaux afin d'en augmenter l'élimination, pourrait être une technique complémentaire intéressante au traitement de l'intoxication au GHB. L'inhibition du transport du GHB avait déjà été envisagée afin de réduire ses concentrations cérébrales (Bhattacharya and Boje, 2006).

Actuellement, la prise en charge des intoxications au GHB consiste essentiellement à une surveillance cardiovasculaire et une intubation endotrachéale si nécessaire, voire à une administration de benzodiazépines en cas de convulsion. Bien que plusieurs traitements antidotiques aient été proposés (physostigmine, naloxone, flumazénil), soit leurs risques associés, soit leur efficacité relative, tendent à ne pas recommander leur emploi. L'emploi d'antagonistes des GABA_B a été proposé mais il n'existe aucune étude clinique et la toxicité humaine n'est pas connue (Schep et coll., 2012).

Tableau 23 : Caractéristiques des transporteurs MCT1, 2, 4 et SMCT1 humains (Halestrap and Meredith, 2004, Srinivas et coll., 2005, Ganapathy et coll., 2008, Morris and Felmler, 2008, Cui and Morris, 2009)

Nom de la protéine	Nom du gène humain	Substrat principal	Mécanisme de transport	Localisation tissulaire
MCT1	SLC16A1	Lactate, pyruvate et corps cétoniques	Cotransport de H^+	Ubiquitaire
MCT2	SLC16A7	Lactate, pyruvate et corps cétoniques	Cotransport de H^+	Testicule, foie, rein, muscle squelettique cœur, cerveau, rate, pancréas
MCT4	SLC16A3	Lactate, pyruvate et corps cétoniques	Cotransport de H^+	Fibres blanches du muscle strié, leucocytes, chondrocytes, testicules, poumon, placenta, cœur tumeurs, cerveau, rein, intestin grêle, épithélium pigmentaire rétinien
SMCT1	SLC5A8	Lactates, pyruvate et corps cétoniques	Cotransport de Na^+	Intestin, reins, cerveau, rétine.
SMCT2	SLC5A12	Lactates, pyruvate et corps cétoniques	Cotransport de Na^+	Muscle squelettique, rein, intestin grêle.

Tableau 24 : Comparaison de substrats et d'inhibiteurs pour les MCT et SMCT humains (Halestrap and Meredith, 2004, Srinivas et coll., 2005, Ganapathy et coll., 2008, Morris and Felmler, 2008, Cui and Morris, 2009)

Protéine	Substrat	Km (mM)	Inhibiteur	Ki (μM)
MCT1	Lactate	3-6	Phlorétine	28
	Pyruvate	1,8-2,5	Quercétine	NA
	Butyrate	9	CHC	425
MCT2	L-Lactate	0,7	CHC	NA
	Pyruvate	0,025-0,1		
MCT4	L-Lactate	28	Phlorétine	41
	D-Lactate	519	CHC	991
	Pyruvate	153		
SMCT1	L-Lactate	0,159-0,235		
	D-Lactate	0,742-1,088		
	Pyruvate	0,387		
	Butyrate	0,072-0,081		
	GHB	0,05-2		
SMCT2	Lactate	49		

CHC α -cyano-4-hydroxycinnamate

NA : non apprécié

Ki : constante d'inhibition

4 Association de l'éthanol et du GHB

L'étude cinétique des concentrations en GHB et en éthanol a été menée après l'étude pléthysmographique. Le temps imparti à ces travaux de thèse ne nous a pas autorisé à tester toutes les doses envisagées ainsi seule l'association des plus fortes doses de GHB et d'éthanol a fait l'objet de dosage.

4.1 Cinétiques sanguines de l'éthanol et du GHB

La coadministration IP du GHB à 600 mg.kg^{-1} et de l'éthanol à 3 g.kg^{-1} n'influe pas sur les concentrations veineuses en éthanol par contre la cinétique sanguine du GHB est modifiée. L'absorption est ralentie : le T_{max} est augmenté ; le C_{max} est augmentée et l'élimination décroît : l' $AUC_{0 \rightarrow 240}$ augmente. Aucun article dans la littérature ne rapporte d'étude cinétique du GHB et de l'éthanol chez le rat après administration IP. Van Sassenbroeck et coll. rapportent une étude des interactions pharmacocinétiques et pharmacodynamiques chez le rat mâle Wistar de 374 g après perfusion IV de solution éthanolique et bolus ou perfusion IV de GHB mais ils concluent sur l'absence d'influence de l'éthanol sur les cinétiques de GHB et réciproquement (Van Sassenbroeck et coll., 2003). Cette unique étude est discordante avec la nôtre mais les différences de protocole peuvent expliquer les résultats divergents.

Ainsi, l'administration IV du GHB fait abstraction de la phase d'absorption. Dans notre étude, celle-ci est nettement ralentie suite à la coadministration IP et perturbe la cinétique dans son ensemble. De plus l'article de Van Sassenbroeck et coll. ne détaille pas les paramètres de perfusion : concentrations et débits. L'influence de celle-ci sur le volume sanguin ne peut être appréciée. Surtout que, lorsqu'ils administrent le GHB en perfusion dans une seconde sous-étude, les concentrations observées sont jusqu'à 45 % plus importantes que

celles attendues, ce qui traduit soit une réduction du volume de distribution, soit une réduction de l'élimination. Enfin, leur étude pharmacocinétique met en évidence une diminution de l'élimination du GHB en présence d'éthanol ce qui est cohérent avec notre étude.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer les variations pharmacocinétiques du GHB après sa coadministration avec l'éthanol. Ces hypothèses ne sont pas contradictoires et pourraient coexister :

- l'éthanol a pu ralentir l'absorption du GHB en raison d'une interaction chimique comme par exemple des liaisons hydrogène entre les fonctions hydroxyles de l'éthanol et du GHB et/ou carboxyle du GHB. L'absorption du GHB pourrait alors être ralentie par un effet « réservoir » de l'éthanol dans la cavité abdominale, l'éthanol étant absorbé plus lentement ;
- l'éthanol et/ou ses métabolites ont pu modifié certains paramètres physiologiques comme le pH sanguin, le transport transmembranaire étant pour partie dépendant du gradient de H^+ , et les débits de perfusion sanguine, en particulier le débit sanguin hépatique, et de fait modifier la pharmacocinétique du GHB ;
- l'éthanol et/ou ses métabolites ont inhibé directement ou indirectement le métabolisme du GHB. Les enzymes à l'origine de l'oxydation des fonctions hydroxyles de l'éthanol et du GHB partagent le même cofacteur : NAD^+ . La consommation de celui-ci lors du métabolisme de l'éthanol aurait réduit sa disponibilité pour celui du GHB. D'ailleurs, en présence d'éthanol, les concentrations de GHB physiologiques sont augmentées (Roth, 1970, Poldrugo and Snead, 1984, Poldrugo and Addolorato, 1999) ;
- l'éthanol et/ou ses métabolites ont inhibé le transport transmembranaire du GHB par les MCT ou SMCT, par compétition : l'acétate et les autres métabolites carboxylés de l'éthanol sont des substrats de ces transporteurs (Ganapathy et coll., 2008), ou par

action de l'éthanol sur la membrane ou le transporteur. Une baisse de l'incorporation cellulaire des lactates, qui partagent le même transporteur, a déjà été mise en évidence en présence d'éthanol et de ses métabolites. Elle était attribuée à une inhibition de la néoglucogénèse mais les transporteurs des monocarboxylates n'étaient pas connus alors et leur participation ne peut être exclue (Tygstrup et coll., 1965, Krebs, 1968, Kreisberg et coll., 1971a, Kreisberg et coll., 1971b, Lundquist et coll., 1973, Juhlin-Dannfelt, 1977).

Quelques soient les mécanismes impliqués, la coadministration d'éthanol et de GHB a modifié la cinétique sanguine de ce dernier. La mise en évidence d'une interaction pharmacodynamique est alors plus délicate en l'absence des cinétiques du GHB au niveau des sites d'action, en particulier le cerveau. Ainsi, dans des investigations futures, la détermination des cinétiques cérébrales du GHB, après sa coadministration IP avec l'éthanol, sera nécessaire afin d'en établir les conséquences sur la disponibilité.

4.2 Effets de l'association de l'éthanol et du GHB

Dans notre étude, certaines variations d'effets du GHB en présence d'éthanol peuvent être expliqué par les modifications cinétiques. Ainsi en présence d'une dose croissante d'éthanol, le nombre d'animaux présentant un coma et la durée de celui-ci augmentent pour les deux doses de GHB testées, ce qui est cohérent avec l'augmentation des concentrations sanguines et la réduction de l'élimination. A l'exception des animaux du groupe GHB 600 mg.kg⁻¹ et éthanol 3 g.kg⁻¹, tous ceux ayant reçu l'association du GHB et de éthanol se sont brutalement réveillés avant la fin de l'expérimentation. De fait, il ne semble pas exister de synergie dans l'effet dépresseur sur la conscience puisque le réveil brutal des animaux (6/8) de G3E3 dans la dernière heure coïncide avec celui des animaux de E3 (4/8). La durée du coma induit par l'éthanol n'a pas été augmentée par le GHB.

Une nouvelle fois, cette observation est en contradiction avec celle rapportée par Van Sassenbroeck et coll. qui ont décelé un effet synergique sur la durée du sommeil (Van Sassenbroeck et coll., 2003). Plusieurs raisons pourraient expliquer cette discordance, (1) soit les rats Wistar présentent une susceptibilité différente des rats Sprague-Dawley, (2) soit l'emploi de GBL, à la place du GHB, a modifié la cinétique ou les effets du GHB formé *in vivo*, (3) soit la durée du sommeil a été appréciée différemment. En effet, dans notre étude, après leur brusque réveil, les rats se rendorment rapidement. Dans leur étude, Van Sassenbroeck et coll. ne font pas mention de ce réveil brutal et peut être n'ont-ils pas considéré ce bref épisode d'éveil comme la fin du sommeil. Dans leur étude de l'interaction de l'éthanol et du GHB sur la sédation chez le rat mâle albinos, McCabe et coll. rapportent une synergie d'effet mais leurs résultats paraissent surprenants. En effet, s'ils trouvent les mêmes durées d'effet que nous lors de l'association, les sédations induites par une dose isolée de 3 g.kg⁻¹ d'éthanol ou par des doses isolées de 260, 343 et 426 mg.kg⁻¹ de GHB semblent extrêmement courtes, toutes inférieures à 30 min. Aucune indication n'étant donnée quant à l'appréciation de ce paramètre, il est impossible de savoir si nous avons apprécié la sédation ou le coma de la même façon (McCabe et coll., 1971).

Les effets sur la conscience de l'association du GHB et de l'éthanol ne semblent pas différents de ceux pour chacune des deux substances administrées isolément. L'augmentation de leur durée est en accord avec les modifications pharmacocinétiques observées. Dans notre étude, aucun signe de synergie pharmacodynamique n'a été mis en évidence.

~ ~ 0 ~ ~

De même, aucun élément ne permet de conclure à une synergie dans les effets sur la thermorégulation. En effet, l'hypothermie marquée induite par la dose de 3 g.kg⁻¹ d'éthanol dans le délai de l'expérimentation n'est pas observée lors de son association aux deux doses

de GHB. Pendant les trois premières heures de l'expérimentation, les modifications de température corporelle des animaux de G3E3 et G6E3 semblent essentiellement dues aux effets du GHB, soit une évolution triphasique de la température d'autant plus marquée que la dose de GHB est importante. En présence d'éthanol, l'hyperthermie transitoire tend à durer plus longtemps ce qui reste cohérent avec les modifications pharmacocinétiques observées. Par contre, la dernière température relevée à 240 min ne se distingue pas significativement de celle du groupe E3.

Seuls Cook et coll. rapportent les résultats d'une étude de l'association du GHB et de l'éthanol sur la température corporelle de souris mâles Swiss-Webster de 25 à 35 g. Ils concluent aux effets synergiques de l'association du GHB à faibles doses (100 mg.kg^{-1} et 300 mg.kg^{-1}) avec l'éthanol sur l'hypothermie observée, mais cette synergie disparaît à 1000 mg.kg^{-1} de GHB (Cook et coll., 2006). Nos résultats sont discordants, mais chez la souris, comme il a été discuté précédemment, les effets du GHB sur la température corporelle semblent différents.

Dans notre étude, chez le rat mâle Sprague-Dawley de 7 à 9 semaines, l'association du GHB et de l'éthanol provoque une variation de température similaire à celle provoquée par le GHB administré isolément pendant les trois premières heures. Après ce délai, seule l'association à la dose de 3 g.kg^{-1} d'éthanol provoque une hypothermie comparable à celle induite par l'éthanol administré isolément. Aucune synergie, ni aucune additivité des effets n'a été observée.

~ ~ 0 ~ ~

Enfin, l'association de l'éthanol au GHB n'a pas modifié la nature des effets respiratoires induits par celui-ci. Ainsi, l'augmentation de T_I suit celle des concentrations sanguines et aboutit à la plus forte concentration à une respiration de type apneustique.

L'éthanol retardant l'absorption du GHB, l'accroissement du T_I est retardé. La phase inspiratoire, apnée incluse, tend, non significativement, à augmenter lors de l'association à l'éthanol, ce qui est cohérent avec l'augmentation de la C_{max} .

A la différence de Morse et coll., nous n'observons pas de baisse de V_T (Morse et coll., 2011) mais à 600 mg.kg^{-1} en présence d'éthanol à 3 g.kg^{-1} , une augmentation consécutive de T_E , une diminution de V_E et du débit inspiratoire moyen. Cette différence d'observation peut être due aux différences de protocole et de technique, (1) leurs animaux sont cathétérisés au niveau des veines jugulaires et fémorales et (2) ils ne semblent pas corriger les volumes expirés en fonction de la température (Morse et coll., 2012b). Pour autant, la réduction du V_E a été observée dans les deux études.

Lors de l'association des plus fortes doses de GHB et d'éthanol, deux phénomènes sont apparus : un accroissement de T_E d'une part et dans les deux dernières heures d'expérimentation une baisse du débit inspiratoire accompagnée d'une baisse de V_E .

L'accroissement de T_E avait déjà été observé lors de l'administration isolée de GHB mais en présence d'éthanol, le phénomène semble exacerbé. La décomposition de cette phase expiratoire en deux éléments : T_{EC} expiration « vraie » et A_E apnée expiratoire révèle un mécanisme plus complexe qu'une simple augmentation de T_E .

En comparaison, lors de la phase inspiratoire, la stimulation nerveuse continue provoque une augmentation de la durée de l'inspiration qui se traduit par des apnées inspiratoires lorsque les capacités pulmonaires maximales sont dépassées. Les centres inspiratoires continuent de commander l'inspiration alors que les poumons sont « pleins » et l'expiration n'est pas déclenchée. Les A_I apparaissent lorsque le T_{IC} est à son maximum.

Pour la phase expiratoire, le mécanisme est différent. Son augmentation retardée est en faveur d'une implication directe ou indirecte du GHB dans son apparition, mais alors que la

C_{max} du GHB est augmentée, le T_{EC} est diminué en présence d'éthanol. Cette observation est cohérente avec la diminution de T_E induite par l'éthanol administré isolément. La part de T_{EC} dans T_E étant réduite en présence d'éthanol, la durée des A_E est augmentée.

L'apparition des A_E peut avoir comme origine un mécanisme de compensation de la respiration de type apneustique induite par le GHB mais son augmentation contemporaine à l'alcoolisation laisse à penser que l'éthanol participe directement ou indirectement à ce phénomène. Ainsi, l'augmentation des apnées expiratoires pourrait être due à l'action du nerf vague qui (1) compenserait les variations respiratoires induites par le GHB et (2) dont l'activité serait modifiée par l'éthanol (Cf. *1.2 Effets de l'éthanol*).

Certains composés exogènes soit directement stimulants, soit irritants pulmonaires peuvent déclencher une stimulation vagale. Celle-ci a des effets biphasiques sur l'expiration, à faible intensité, elle réduit T_{EC}, puis quand l'intensité augmente, elle augmente la durée des A_E (Vijayaraghavan et coll., 1993). Par contre cette augmentation de la durée des A_E est légèrement décalée par rapport à la diminution du V_E, et ne peut expliquer complètement la diminution de la ventilation.

En effet, en plus des variations du rythme respiratoire, l'association du GHB et de l'éthanol provoque lors des deux dernières heures de l'expérimentation une baisse significative du débit inspiratoire. Ce type de baisse du débit a déjà été observé lors de l'association de l'éthanol au THC. Elle pourrait traduire une augmentation des résistances des voies aériennes supérieures. Comme nous l'avons déjà rappelé, l'augmentation des résistances des voies aériennes suite à une alcoolisation est connue (Robinson et coll., 1985, Robinson and Zwillich, 1985, Karkoulas et coll., 2008, Vecchio et coll., 2010, Horner, 2011) mais administré isolément ni l'éthanol, ni le GHB n'a provoqué ce phénomène. Lors de leur association, V_E est diminué mais il n'y a pas de baisse significative de V_T. Les cinétiques

d'augmentation du T_I et du V_T sont différentes, V_T se normalisant plus rapidement que T_I . Après deux heures, même plus longues les inspirations mobilisent un volume d'air moindre. Les mécanismes de compensation semblent donc dépassés d'autant que T_E reste augmenté, V_E ne peut pas alors être conservé.

La part imputable à chacune des substances ne peut être clairement établie, mais l'apparition de cette diminution du flux inspiratoire lors de l'association de l'éthanol au THC et au GHB, accroît les présomptions quant à la participation de l'éthanol à l'émergence de ce phénomène. Le GHB, comme le THC précédemment, a pu par contre participé à l'apparition de cet effet soit directement, soit indirectement par modification du rythme respiratoire ou altération de la conscience par exemple. D'autant que les effets propres du GHB, comme précédemment du THC, ont vraisemblablement réduit les capacités de compensation d'où l'hypopnée.

Dans ce contexte, il serait important de déterminer les gaz du sang après administration de l'association du GHB à 600 mg.kg^{-1} et de l'éthanol à 3 g.kg^{-1} , afin de déterminer si l'hypopnée observée provoque une insuffisance respiratoire. Malheureusement, il n'a pas été possible de mener cette étude suite à la panne définitive de l'appareil des gaz du sang.

4.3 Modèle

L'étude des cinétiques sanguines artérielles et des effets respiratoires de l'association de l'éthanol et du GHB chez le rat mâle Sprague-Dawley âgé de 7 à 9 semaines après administration par voie IP a mis en évidence :

- une interaction pharmacocinétique entre l'éthanol et le GHB qui modifie l'absorption et l'élimination de ce dernier. Cette interaction n'avait jamais été rapportée mais ces deux substances n'avaient pas été étudiées après leur administration conjointe par voie

IP. Les concentrations des solutions éthanoliques correspondent à celles des boissons alcoolisées commercialisées et consommées. Il ne peut être exclu qu'une telle interaction intervienne après l'absorption *per os* de GHB et d'alcool. Ces modifications cinétiques ont des conséquences sur la cinétique des effets induits ;

- aucune synergie d'effets n'a été observée concernant l'altération de la conscience, la thermorégulation ou la respiration de type apneustique. Il ne semble pas exister non plus d'additivité pour ces effets. Les effets observés sont ceux du GHB, les modifications pharmacocinétiques expliquant les variations observées ;
- une synergie d'effet sur les apnées expiratoires et sur la réduction de la ventilation a par contre été observée. L'association de l'éthanol et du GHB à leurs plus fortes doses testées a provoqué une augmentation importante des apnées expiratoires et en fin d'expérimentation une diminution du débit inspiratoire avec baisse de la ventilation minute mais les conséquences de cette hypopnée sur les gaz du sang n'ont pas pu être vérifiées.

Comme nous l'avons précisé précédemment, l'être humain dispose de systèmes enzymatiques, de transporteurs et de récepteurs équivalents à ceux du rat. S'il peut constituer un bon modèle pour l'administration isolée de chacune des substances, il peut l'être aussi pour leur association.

Dans une étude sur les interactions pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du GHB et de l'éthanol chez l'homme, Thai et coll. rapportent, après administration orale des deux substances, une tendance à l'augmentation de C_{max} et de l'AUC et à la diminution de la clairance, ainsi qu'une baisse de la saturation en oxygène et une augmentation de la température de la peau, lors de la première heure, de 1,6 °C non significativement différente de celle provoqué par le GHB seul (Thai et coll., 2006). L'élimination urinaire humaine du

GHB semble aussi affectée par la coadministration d'éthanol, puisqu'elle serait réduite dans les trois premières heures suivants l'administration des substances (Haller et coll., 2006). Ces résultats sont cohérents avec les nôtres.

L'association de l'éthanol et du GHB est souvent considérée comme synergique (Okun et coll., 2001, Liechti et coll., 2006, Shbair et coll., 2010) mais peu d'études cinétiques ont été réalisées et l'interaction pharmacocinétique n'a pas clairement été établie. Si l'interaction pharmacocinétique que nous avons observée devait être confirmée chez l'homme, l'appréciation des effets liés à la consommation contemporaine d'éthanol et de GHB devra être réévaluée en termes de synergie pharmacodynamique. D'autant que cette association est fréquemment rapportée dans les cas d'intoxications au GHB ayant nécessité une hospitalisation ou ayant abouti au décès du consommateur (Miro et coll., 2002, Caldicott et coll., 2004, Couper et coll., 2004, Liechti and Kupferschmidt, 2004, Knudsen et coll., 2010).

L'interaction pharmacocinétique que nous avons observée pourrait avoir aussi des conséquences sur :

- le traitement à mettre en œuvre. Il conviendra maintenant de considérer l'éthanolémie, ses effets et les conséquences du traitement sur son évolution. L'interaction pourrait réduire l'efficacité des soins prodigués voire aggraver la symptomatologie ;
- l'interprétation des concentrations sanguines en GHB tant en clinique que toxicologie judiciaire. En présence d'éthanol, la dose supposée ingérée de GHB, calculée à partir des concentrations mesurées, pourrait être surestimée ;
- la toxicité du GHB chez des individus déficitaires en enzymes du métabolisme de l'éthanol. Les mécanismes d'interaction n'ayant pas été établis, il ne peut être écarté une interaction plus importante avec une augmentation accrue du GHB sanguin.

Chapitre 7 : Conclusion

En préambule de notre conclusion, il convient de souligner que l'ensemble de ces travaux de thèse a été focalisé sur l'étude des effets respiratoires des substances et associations testées chez l'animal vigíl avec toutes les contraintes que ceci impose. Par conséquent, les études associées sur l'état de conscience des animaux et les pharmacocinétiques n'ont pas été menées selon les règles propres à chaque domaine mais les résultats obtenus n'avaient pour seule vocation qu'à conforter notre modèle d'étude des effets respiratoires des produits seuls ou en association.

Au terme de ces travaux de thèse, les observations rapportées nous permettent de répondre aux questions initiales de la façon suivante :

L'éthanol provoque-t-il une modification de la respiration à faible ou forte dose ?

Avec notre modèle animal, aucune modification de la respiration de repos, ni des gaz du sang, n'a été induite par l'administration de doses d'éthanol comprises entre 0,125 et 1,5 g.kg⁻¹ d'éthanol. Seules les plus fortes doses d'éthanol : 3 et 4,5 g.kg⁻¹, tendent à provoquer des modifications du mode respiratoire, à savoir des tachypnées avec réduction du temps expiratoire. Ces modifications sont sans conséquence sur l'hématose car elles ne provoquent pas d'altération d'origine respiratoire des gaz du sang. Les capacités d'adaptation à une hypercapnie modérée de 5 % sont aussi conservées. L'acidémie observée à ces deux plus fortes doses est métabolique et la formation de métabolites acides lors du catabolisme de l'éthanol en est au moins partiellement à l'origine.

Lors de l'association du THC à l'éthanol, les effets respiratoires sont-ils modifiés ? Le cas échéant, existe-t-il une potentialisation, inhibition ou addition des effets ?

Dans notre modèle, l'association de l'éthanol au THC a induit une augmentation d'intensité et de durée des signes cliniques et des modifications de la température corporelle, ce qui est en faveur au moins d'une additivité voire d'une synergie d'effet.

D'un point de vue respiratoire, les effets du THC sont conservés lors de son association à 1 g.kg⁻¹ d'éthanol. Seule une augmentation plus précoce du temps inspiratoire est observée avec l'association du THC à 3 mg.kg⁻¹ et de l'éthanol à 1 g.kg⁻¹, mais une modification de la biodisponibilité du THC liée au mode d'administration de l'association ne peut être exclue. L'association au THC à 8,4 mg.kg⁻¹ à plus forte dose d'éthanol : 3 g.kg⁻¹, tend à diminuer la ventilation minute par réduction significative du volume courant sans effet sur la fréquence. La diminution du volume courant précède l'installation de l'hypothermie.

Les effets respiratoires du GHB peuvent-ils être précisés par l'emploi de la pléthysmographie corps entier ?

L'étude par pléthysmographie corps entier de la respiration du rat Sprague-Dawely mâle de 7 à 9 semaines après administration IP de GHB a confirmé la bradypnée rapportée dans la littérature. Cette bradypnée a pour origine une respiration de type apneustique observée pour les doses supérieures à 300 mg.kg⁻¹.

L'éthanol administré concomitamment au GHB modifie-t-il les effets de celui-ci ? Le cas échéant, y a-t-il potentialisation, inhibition ou addition des effets ?

La coadministration d'éthanol de 1 à 3 g.kg⁻¹ et de GHB de 300 à 600 mg.kg⁻¹ à notre modèle animal n'a pas potentialisé les effets cliniques. Les modifications de la température corporelle et la respiration de type apneustique correspondent à celles observées lors de l'administration isolée de GHB. Les modifications de cinétique des effets peuvent être expliquées par l'interaction pharmacocinétique observée après administration IP.

Par contre, l'association de l'éthanol à 3 g.kg⁻¹ au GHB à 600 mg.kg⁻¹, en plus des effets rapportés, a augmenté la durée des pauses, que nous avons appelées apnées expiratoires. Cette augmentation n'est pas expliquée par la seule modification de biodisponibilité du GHB, il y a eu potentialisation des effets. Enfin, lors de cette association, une baisse de la ventilation minute a aussi été notée.

Cette potentielle interaction a-t-elle une origine pharmacocinétique ou pharmacodynamique ?

Les deux types d'interactions, pharmacocinétique et pharmacodynamique, ont donc été observées. Cette interaction pharmacocinétique n'avait jamais été rapportée et devra être confirmée *per os* à des doses équivalentes à celles testées. Nos résultats suggèrent une modification de l'absorption et confirment une altération de l'élimination mais en apportant une traduction clinique de celle-ci. Cette étude ne permet pas d'inférer une modification de la distribution.

Ainsi, lors des associations de l'éthanol à 3 g.kg⁻¹ au THC à 8,4 mg.kg⁻¹ ou au GHB à 600 mg.kg⁻¹, il y a eu, dans les deux cas, baisse de la ventilation minute et du débit inspiratoire moyen. Ces effets n'ont pas été observés lors de l'administration isolée de chacune des substances et l'évolution des paramètres respiratoires laisse à penser que les mécanismes sont différents. Pour autant, il serait important, dans une étude future :

- de vérifier les conséquences de la baisse de ventilation sur les gaz du sang.
L'hypoventilation pourrait être à l'origine d'une insuffisance respiratoire ;
- de mesurer la résistance de voies aériennes supérieures. L'éthanol les augmentant, cet effet pourrait expliquer la baisse du débit inspiratoire moyen ;
- de compléter les études en hypoxie et en hypercapnie pour étudier l'origine centrale de ces perturbations.

Enfin, toutes les substances et associations testées ont eu un effet sur la température corporelle des animaux. Si, à forte dose, le GHB et ses associations ont provoqué une hyperthermie transitoire, en fin d'expérimentation les animaux présentés des hypothermies marquées comme pour les autres substances. Ces hypothermies, mesurées à la température du laboratoire (20~22°C), pourraient être plus intenses à des températures plus basses et provoquer par elles-mêmes un trouble de conscience voire le décès par arrêt cardiaque.

Bibliographie

- ABANADES, S., FARRE, M., BARRAL, D., TORRENS, M., CLOSAS, N., LANGOHR, K., PASTOR, A. & DE LA TORRE, R. (2007) Relative abuse liability of gamma-hydroxybutyric acid, flunitrazepam, and ethanol in club drug users. *J Clin Psychopharmacol*, 27, 625-38.
- ABANADES, S., FARRE, M., SEGURA, M., PICHINI, S., BARRAL, D., PACIFICI, R., PELLEGRINI, M., FONSECA, F., LANGOHR, K. & DE LA TORRE, R. (2006) Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Ann N Y Acad Sci*, 1074, 559-76.
- ABBOUD, R. T. & SANDERS, H. D. (1976) Effect of oral administration of delta-tetrahydrocannabinol on airway mechanics in normal and asthmatic subjects. *Chest*, 70, 480-5.
- ABEL, E. L., MCMILLAN, D. E. & HARRIS, L. S. (1974) δ 9-Tetrahydrocannabinol: Effects of route of administration on onset and duration of activity and tolerance development. *Psychopharmacology (Berl)*, 35, 29-38.
- ADANIR, T., SENCAN, A., COKBOZ, I. & KARAHAN, N. (2008) An unusual complication: intravenous administration of ethyl alcohol. *Acta Anaesthesiol Scand*, 52, 1028-9.
- ALTOSE, M. D. & HUDGEL, D. W. (1986) The pharmacology of respiratory depressants and stimulants. *Clin Chest Med*, 7, 481-94.
- ANDRIAMAMPANDRY, C., TALEB, O., KEMMEL, V., HUMBERT, J. P., AUNIS, D. & MAITRE, M. (2007) Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *Faseb J*, 21, 885-95.
- ANDRIAMAMPANDRY, C., TALEB, O., VIRY, S., MULLER, C., HUMBERT, J. P., GOBAILLE, S., AUNIS, D. & MAITRE, M. (2003) Cloning and characterization of a rat brain receptor that binds the endogenous neuromodulator gamma-hydroxybutyrate (GHB). *Faseb J*, 17, 1691-3.
- Anonyme (1997a) From the Centers for Disease Control and Prevention. Gamma hydroxy butyrate use--New York and Texas, 1995-1996. *Jama*, 277, 1511.
- Anonyme (1997b) Gamma hydroxy butyrate use--New York and Texas, 1995-1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 46, 281-3.
- APPELMAN, L. M., WOUTERSEN, R. A. & FERON, V. J. (1982) Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. I. Acute and subacute studies. *Toxicology*, 23, 293-307.
- ARENA, C. & FUNG, H. L. (1980) Absorption of sodium gamma-hydroxybutyrate and its prodrug gamma-butyrolactone: relationship between in vitro transport and in vivo absorption. *J Pharm Sci*, 69, 356-8.
- AUZEPY, P., BOUTRON, H. F., RICHARD, C. & RIOU, B. (1985) [In France, is acute alcoholic intoxication in adults a metabolic emergency?]. *Rev Med Interne*, 6, 373-9.
- BANIA, T. C. & CHU, J. (2005) Physostigmine does not effect arousal but produces toxicity in an animal model of severe gamma-hydroxybutyrate intoxication. *Acad Emerg Med*, 12, 185-9.

- BARTLETT, D., JR. & TENNEY, S. M. (1970) Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol*, 10, 384-95.
- BAVIS, R. W., JOHNSON, R. A., ORDING, K. M., OTIS, J. P. & MITCHELL, G. S. (2006) Respiratory plasticity after perinatal hypercapnia in rats. *Respir Physiol Neurobiol*, 153, 78-91.
- BAVIS, R. W., RUSSELL, K. E., SIMONS, J. C. & OTIS, J. P. (2007) Hypoxic ventilatory responses in rats after hypercapnic hyperoxia and intermittent hyperoxia. *Respir Physiol Neurobiol*, 155, 193-202.
- BECK, F., GUIGNARD, R., RICHARD, J.-B., TOVAR, M.-L. & SPILKA, S. (2011) Les niveaux d'usage des drogues en France en 2010. *Tendances*, 76.
- BECK, F., LEGLEYE, S. & PERETTI-WATTEL, P. (2001) Drogues illicites : pratiques et attitudes. *Baromètre Santé 2000. Résultats Volume 2*. CFES ed. Vanves.
- BEJANIAN, M., FINN, D. A., SYAPIN, P. J. & ALKANA, R. L. (1990) Body temperature and ethanol pharmacokinetics in temperature-challenged mice. *Alcohol*, 7, 331-7.
- BELESLIN, D. B., DJOKANOVIC, N., JOVANOVIC MICIC, D. & SAMARDZIC, R. (1997) Opposite effects of GABAA and NMDA receptor antagonists on ethanol-induced behavioral sleep in rats. *Alcohol*, 14, 167-73.
- BELL, H. J. & HAOUZI, P. (2009) Acetazolamide suppresses the prevalence of augmented breaths during exposure to hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297, R370-81.
- BELLVILLE, J. W., SWANSON, G. D. & AQLEH, K. A. (1975) Respiratory effects of delta-9-tetrahydrocannabinol. *Clin Pharmacol Ther*, 17, 541-548.
- BELLVILLE, J. W., SWANSON, G. D., MIYAKE, T. & AQLEH, K. A. (1976) Respiratory stimulation observed following ethanol ingestion. *West J Med*, 124, 423-5.
- BENAVIDES, J., RUMIGNY, J. F., BOURGUIGNON, J. J., CASH, C., WERMUTH, C. G., MANDEL, P., VINCENDON, G. & MAITRE, M. (1982a) High affinity binding sites for gamma-hydroxybutyric acid in rat brain. *Life Sci*, 30, 953-61.
- BENAVIDES, J., RUMIGNY, J. F., BOURGUIGNON, J. J., WERMUTH, C. G., MANDEL, P. & MAITRE, M. (1982b) A high-affinity, Na⁺-dependent uptake system for gamma-hydroxybutyrate in membrane vesicles prepared from rat brain. *J Neurochem*, 38, 1570-5.
- BERNSTEIN, J. G., KUEHNLE, J. C. & MENDELSON, J. H. (1976) Medical implications of marijuana use. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 3, 347-61.
- BHATTACHARYA, I. & BOJE, K. M. (2004) GHB (gamma-hydroxybutyrate) carrier-mediated transport across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 311, 92-8.
- BHATTACHARYA, I. & BOJE, K. M. (2006) Potential gamma-hydroxybutyric acid (GHB) drug interactions through blood-brain barrier transport inhibition: a pharmacokinetic simulation-based evaluation. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 33, 657-81.
- BOBO, M. W. (1972) Effects of alcohol upon maximum oxygen uptake, lung ventilation, and heart rate. *Res Q*, 43, 1-6.
- BONITENKO, E. Y., GREBENYUK, A. N., BASHARIN, V. A., IVANOV, M. B. & MAKAROVA, N. V. (2010) Evaluation of the neurological status in experimental acute alcohol intoxication. *Bull Exp Biol Med*, 149, 324-7.

- BONORA, M., SHIELDS, G. I., KNUTH, S. L., BARTLETT, D., JR. & ST JOHN, W. M. (1984) Selective depression by ethanol of upper airway respiratory motor activity in cats. *Am Rev Respir Dis*, 130, 156-61.
- BORBELY, A. A. & HUSTON, J. P. (1972) Gamma-butyrolactone: an anesthetic with hyperthermic action in the rat. *Experientia*, 28, 1455.
- BORISON, H. L., HARANATH, P. S. & MCCARTHY, L. E. (1972) Respiratory responses to chemical pulses in the cerebrospinal fluid of cats. *Br J Pharmacol*, 44, 605-16.
- BORMANN, J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 21, 16-9.
- BOUTHOOIN, S. H., VAN DER PLOEG, T., VAN ERKEL, N. E. & VAN DER LELY, N. (2011) Alcohol intoxication among Dutch adolescents: acute medical complications in the years 2000-2010. *Clin Pediatr (Phila)*, 50, 244-51.
- BOWERY, N. G., BETTLER, B., FROESTL, W., GALLAGHER, J. P., MARSHALL, F., RAITERI, M., BONNER, T. I. & ENNA, S. J. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev*, 54, 247-64.
- BOYD, J. J., KUISMA, M. J. & RANDELL, T. T. (2012) Temporal differences in gamma-hydroxybutyrate overdoses involving injecting drug users versus recreational drug users in Helsinki: a retrospective study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 20, 7.
- BRACKETT, D. J., GAUVIN, D. V., LERNER, M. R., HOLLOWAY, F. A. & WILSON, M. F. (1994) Dose- and time-dependent cardiovascular responses induced by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther*, 268, 78-84.
- BRAGGINS, T. J. & CROW, K. E. (1981) The effects of high ethanol doses on rates of ethanol oxidation in rats. A reassessment of factors controlling rates of ethanol oxidation in vivo. *Eur J Biochem*, 119, 633-40.
- BRUCE, R. D. (1985) An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fundam Appl Toxicol*, 5, 151-7.
- BRUCE, R. D. (1987) A confirmatory study of the up-and-down method for acute oral toxicity testing. *Fundam Appl Toxicol*, 8, 97-100.
- BRUN-PASCAUD, M., GAUDEBOUT, C., BLAYO, M. C. & POCIDALO, J. J. (1982) Arterial blood gases and acid-base status in awake rats. *Respir Physiol*, 48, 45-57.
- BUDZINSKA, K. (2005) Biphasic effect of ethyl alcohol on short-term potentiation of the respiratory activity in the rabbit. *J Physiol Pharmacol*, 56 Suppl 4, 31-8.
- BUSSELBERG, D., BISCHOFF, A. M., PATON, J. F. & RICHTER, D. W. (2001) Reorganisation of respiratory network activity after loss of glycinergic inhibition. *Pflugers Arch*, 441, 444-9.
- CABAL, C. (2002) L'élaboration d'un discours scientifique sur les dangers des drogues doit intégrer les polytoxicomanies. *Rapport sur l'impact éventuel de la consommation des drogues sur la santé mentale de leurs consommateurs*. Paris.
- CADET-TAÏROU, A. & GANDILHON, M. (2009) Usage de GHB et GBL-Données issues du dispositif TREND. Observatoire français des drogues et des toxicomanies (OFDT).
- CALDICOTT, D. G., CHOW, F. Y., BURNS, B. J., FELGATE, P. D. & BYARD, R. W. (2004) Fatalities associated with the use of gamma-hydroxybutyrate and its analogues in Australasia. *Med J Aust*, 181, 310-3.

- CALIGNANO, A., KÁTONA, I., DÉSARNAUD, F., GIUFFRIDA, A., RANA, G. L., MACKIE, K., FREUND, T. F. & PIOMELLI, D. (2000) Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature*, 408, 96-101.
- CARAI, M. A., COLOMBO, G., BRUNETTI, G., MELIS, S., SERRA, S., VACCA, G., MASTINU, S., PISTUDDI, A. M., SOLINAS, C., CIGNARELLA, G., MINARDI, G. & GESSA, G. L. (2001) Role of GABA(B) receptors in the sedative/hypnotic effect of gamma-hydroxybutyric acid. *Eur J Pharmacol*, 428, 315-21.
- CARLEY, D. W., PAVIOVIC, S., JANELIDZE, M. & RADULOVACKI, M. (2002) Functional role for cannabinoids in respiratory stability during sleep. *Sleep*, 25, 391-398.
- CARLINI, E. A., LINDSEY, C. J. & TUFIK, S. (1976) Environmental and drug interference with effects of marihuana. *Ann N Y Acad Sci*, 281, 229-43.
- CARLTON, J., KHAN, S. I., HAQ, W., MIZUMA, H., RAGAN, F. A., JR., MATHUR, K. B., SHUKLA, R., SRIMAL, R. C. & PRASAD, C. (1995) Attenuation of alcohol-induced hypothermia by cyclo (His-Pro) and its analogs. *Neuropeptides*, 28, 351-5.
- CASALI, L., POZZI, E., RAMPULLA, C. & SERRA, R. (1977) Psychotropic drugs: influence on respiratory function. *Int J Clin Pharmacol Biopharm*, 15, 480-4.
- CASTELLI, M. P., FERRARO, L., MOCCI, I., CARTA, F., CARAI, M. A., ANTONELLI, T., TANGANELLI, S., CIGNARELLA, G. & GESSA, G. L. (2003) Selective gamma-hydroxybutyric acid receptor ligands increase extracellular glutamate in the hippocampus, but fail to activate G protein and to produce the sedative/hypnotic effect of gamma-hydroxybutyric acid. *J Neurochem*, 87, 722-32.
- CHEVILLARD, L., MEGARBANE, B., RISEDE, P. & BAUD, F. J. (2009) Characteristics and comparative severity of respiratory response to toxic doses of fentanyl, methadone, morphine, and buprenorphine in rats. *Toxicol Lett*, 191, 327-40.
- CHÈZE, M., HOIZEY, G., DEVEAUX, M., MUCKENSTURM, A., VAYSSETTE, F., BILLAULT, F. & PÉPIN, G. (2012) Une série de nouveaux cas d'intoxications par le GHB ou la GBL. Dosages dans le sang, l'urine et les phanères. *Ann Toxicol Anal*, 24, 59-65.
- CHIN, R. L., SPORER, K. A., CULLISON, B., DYER, J. E. & WU, T. D. (1998) Clinical course of gamma-hydroxybutyrate overdose. *Ann Emerg Med*, 31, 716-22.
- CHO, C. H., MEI, Q. B. & KAN, S. K. (1994) The intraperitoneal effects of 5-hydroxytryptamine on haemodynamics, gastric mucosal blood flow and platelet aggregation. *Eur J Pharmacol*, 256, 9-15.
- CHUCK, T. L., MCLAUGHLIN, P. J., ARIZZI-LAFRANCE, M. N., SALAMONE, J. D. & CORREA, M. (2006) Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. *Life Sci*, 79, 154-61.
- CICCOCIOPPO, R., ANTONELLI, L., BIONDINI, M., PERFUMI, M., POMPEI, P. & MASSI, M. (2002) Memory impairment following combined exposure to delta(9)-tetrahydrocannabinol and ethanol in rats. *Eur J Pharmacol*, 449, 245-252.
- COHEN, R. D. & WOODS, H. F. (1976) *Clinical and Biochemical Aspects of Lactic Acidosis*, Oxford, London, Edinburgh, and Melbourne, Blackwell Scientific Publications.

- COOK, C. D., BIDDLESTONE, L., COOP, A. & BEARDSLEY, P. M. (2006) Effects of combining ethanol (EtOH) with gamma-hydroxybutyrate (GHB) on the discriminative stimulus, locomotor, and motor-impairing functions of GHB in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 185, 112-22.
- COUPER, F. J., THATCHER, J. E. & LOGAN, B. K. (2004) Suspected GHB overdoses in the emergency department. *J Anal Toxicol*, 28, 481-4.
- CRABB, D. W., YOUNT, E. A. & HARRIS, R. A. (1981) The metabolic effects of dichloroacetate. *Metabolism*, 30, 1024-39.
- CUI, D. & MORRIS, M. E. (2009) The drug of abuse gamma-hydroxybutyrate is a substrate for sodium-coupled monocarboxylate transporter (SMCT) 1 (SLC5A8): characterization of SMCT-mediated uptake and inhibition. *Drug Metab Dispos*, 37, 1404-10.
- CUI, Y.-Y., D'AGOSTINO, B., RISSE, P.-A., MARROCCO, G., NALINE, E., ZHANG, Y., CHEN, H.-Z., FINANCE, O., RINALDI-CARMONA, M., ROSSI, F. & ADVENIER, C. (2007) Cannabinoid CB(2) receptor activation prevents bronchoconstriction and airway oedema in a model of gastro-oesophageal reflux. *Eur J Pharmacol*, 573, 206-213.
- CUNNINGHAM, C. L. & BISCHOF, L. L. (1987) Stress and ethanol-induced hypothermia. *Physiol Behav*, 40, 377-82.
- CUNNINGHAM, J. J., MOLNAR, J. A., MEARA, P. A. & BODE, H. H. (1986) In vivo total body electrical conductivity following perturbations of body fluid compartments in rats. *Metabolism*, 35, 572-5.
- DA SILVA, G. E., MORATO, G. S. & TAKAHASHI, R. N. (2001) Rapid tolerance to Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cross-tolerance between ethanol and Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *Eur J Pharmacol*, 431, 201-207.
- DAR, M. S. (2000) Cerebellar CB(1) receptor mediation of Delta(9)-THC-induced motor incoordination and its potentiation by ethanol and modulation by the cerebellar adenosinergic A(1) receptor in the mouse. *Brain Res*, 864, 186-194.
- DAVIS, S. E., SOLHIED, G., CASTILLO, M., DWINELL, M., BROZOSKI, D. & FORSTER, H. V. (2006) Postnatal developmental changes in CO2 sensitivity in rats. *J Appl Physiol*, 101, 1097-103.
- DE CEAURRIZ, J. C., MICILLINO, J. C., BONNET, P. & GUENIER, J. P. (1981) Sensory irritation caused by various industrial airborne chemicals. *Toxicol Lett*, 9, 137-43.
- DEGENHARDT, L., DARKE, S. & DILLON, P. (2003) The prevalence and correlates of gamma-hydroxybutyrate (GHB) overdose among Australian users. *Addiction*, 98, 199-204.
- DEITRICH, R. A., DUNWIDDIE, T. V., HARRIS, R. A. & ERWIN, V. G. (1989) Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. *Pharmacol Rev*, 41, 489-537.
- DELONG, G. T., WOLF, C. E., POKLIS, A. & LICHTMAN, A. H. (2010) Pharmacological evaluation of the natural constituent of Cannabis sativa, cannabichromene and its modulation by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Drug Alcohol Depend*, 112, 126-33.

- DEVEAUX, M. (1999) L'alcool. IN MURA, P. (Ed.) *Alcool, médicaments, stupéfiants et conduite automobile*. Paris, Elsevier.
- DEVEAUX, M. (2002) L'acide gamma-hydroxybutyrique (GHB) : un vieux produit, de nouveaux problèmes. *Ann Toxicol Anal*, 14, 417-423.
- DICKERMAN, J. D., BISHOP, W. & MARKS, J. F. (1968) Acute ethanol intoxication in a child. *Pediatrics*, 42, 837-40.
- DIEHL, K. H., HULL, R., MORTON, D., PFISTER, R., RABEMAMPIANINA, Y., SMITH, D., VIDAL, J. M. & VAN DE VORSTENBOSCH, C. (2001) A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*, 21, 15-23.
- DIXON, W. J. (1965) The Up-and-Down Method for Small Samples. *J. Am. Stat. Assoc.*, 60, 967-978.
- DIXON, W. J. (1991) Staircase bioassay: the up-and-down method. *Neurosci Biobehav Rev*, 15, 47-50.
- DOHERTY, P. A., MCCARTHY, L. E. & BORISON, H. L. (1983) Respiratory and cardiovascular depressant effects of nabilone, N-methyllevonantradol and delta 9-tetrahydrocannabinol in anesthetized cats. *J Pharmacol Exp Ther*, 227, 508-516.
- DRORBAUGH, J. E. & FENN, W. O. (1955) A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, 16, 81-7.
- DUARTE, T., HOUZÉ, P., RISÈDE, P., POPE, C., SCHERRMANN, J. M. & BAUD, F. J. (2010) Dose-dependent effects on ventilation at rest induced by high doses of cannabinoids. *Acta Clin Belg*, 65, 90-9.
- DUNDEE, J. W., ISAAC, M., PANDIT, S. K. & MCDOWELL, S. A. (1970) Clinical studies of induction agents. XXXIV: Further investigations with ethanol. *Br J Anaesth*, 42, 300-10.
- DUTSCHMANN, M. & PATON, J. F. (2002a) Influence of nasotrigeminal afferents on medullary respiratory neurones and upper airway patency in the rat. *Pflugers Arch*, 444, 227-35.
- DUTSCHMANN, M. & PATON, J. F. (2002b) Inhibitory synaptic mechanisms regulating upper airway patency. *Respir Physiol Neurobiol*, 131, 57-63.
- EFTHIVOULOU, M. A., PHILLIPS, J. W. & BERRY, M. N. (1995) Abolition of the inhibitory effect of ethanol oxidation on gluconeogenesis from lactate by asparagine or low concentrations of ammonia. *Biochim Biophys Acta*, 1244, 303-10.
- EGGERS, E. D. & BERGER, A. J. (2004) Mechanisms for the modulation of native glycine receptor channels by ethanol. *J Neurophysiol*, 91, 2685-95.
- EISER, A. R. (1987) The effects of alcohol on renal function and excretion. *Alcohol Clin Exp Res*, 11, 127-38.
- ESTRADA, U., BRASE, D. A., MARTIN, B. R. & DEWEY, W. L. (1987) Cardiovascular effects of delta 9- and delta 9(11)-tetrahydrocannabinol and their interaction with epinephrine. *Life Sci*, 41, 79-87.
- FAINGOLD, C. L., N'GOUEMO, P. & RIAZ, A. (1998) Ethanol and neurotransmitter interactions--from molecular to integrative effects. *Prog Neurobiol*, 55, 509-35.

- FANKHAUSER, M. (2008) Cannabis as medicine in Europe in the 19th century. IN SZNITMAN, S. R., OLSSON, B. & ROOM, R. (Eds.) *A cannabis reader: global issues and local experiences*. Lisbon, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
- FELMLEE, M. A. (2010) γ -Hydroxybutyric Acid Toxicokinetics and Toxicodynamics. *Faculty of the Graduate School*. Buffalo, State University of New York.
- FELMLEE, M. A., ROIKO, S. A., MORSE, B. L. & MORRIS, M. E. (2010a) Concentration-effect relationships for the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 333, 764-71.
- FELMLEE, M. A., WANG, Q., CUI, D., ROIKO, S. A. & MORRIS, M. E. (2010b) Mechanistic toxicokinetic model for gamma-hydroxybutyric acid: inhibition of active renal reabsorption as a potential therapeutic strategy. *AAPS J*, 12, 407-16.
- FENNESSY, M. R. & TAYLOR, D. A. (1977) The effect of delta9-tetrahydrocannabinol on body temperature and brain amine concentrations in the rat at different ambient temperatures. *Br J Pharmacol*, 60, 65-71.
- FENNESSY, M. R. & TAYLOR, D. A. (1978) Antagonism of the effects on thermoregulation of delta9-tetrahydrocannabinol by clomipramine in the rat. *Br J Pharmacol*, 63, 267-73.
- FERKO, A. P. & BOBYOCK, E. (1978) Physical dependence on ethanol: rate of ethanol clearance from the blood and effect of ethanol on body temperature in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 46, 235-48.
- FERKO, A. P. & BOBYOCK, E. (1979) Rates of ethanol disappearance from blood and hypothermia following acute and prolonged ethanol inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 50, 417-27.
- FERRARA, S. D., TEDESCHI, L., FRISON, G., ORLANDO, R., MAZZO, M., ZORDAN, R., PADRINI, R. & PALATINI, P. (1996) Effect of moderate or severe liver dysfunction on the pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid. *Eur J Clin Pharmacol*, 50, 305-10.
- FERRARA, S. D., ZOTTI, S., TEDESCHI, L., FRISON, G., CASTAGNA, F., GALLIMBERTI, L., GESSA, G. L. & PALATINI, P. (1992) Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid in alcohol dependent patients after single and repeated oral doses. *Br J Clin Pharmacol*, 34, 231-5.
- FLEMING, M. P. & CLARKE, R. C. (1998) Physical evidence for the antiquity of Cannabis sativa L. *Journal of the International Hemp Association*, 5, 80-92.
- FORNEY, R. B. (1971) Toxicology of marihuana. *Pharmacol Rev*, 23, 279-284.
- FORNEY, R. B. & HARGER, R. N. (1969) Toxicology of ethanol. *Annu Rev Pharmacol*, 9, 379-92.
- FORSANDER, O. A. (1966) Influence of the metabolism of ethanol on the lactate/pyruvate ratio of rat-liver slices. *Biochem J*, 98, 244-7.
- FORSANDER, O. A., MAENPAA, P. H. & SALASPURO, M. P. (1965) Influence of ethanol on the lactate/pyruvate and beta-hydroxybutyrate/acetoacetate ratios in rat liver experiments. *Acta Chem Scand*, 19, 1770-1.

- FORSANDER, O. A. & RAIHA, N. C. (1960) Metabolites produced in the liver during alcohol oxidation. *J Biol Chem*, 235, 34-6.
- FREUND, G. (1973) Hypothermia after acute ethanol and benzyl alcohol administration. *Life Sci*, 13, 345-9.
- FREUND, T. F., KATONA, I. & PIOMELLI, D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, 83, 1017-66.
- FULLER, D. D., DOPERALSKI, N. J., DOUGHERTY, B. J., SANDHU, M. S., BOLSER, D. C. & REIER, P. J. (2008) Modest spontaneous recovery of ventilation following chronic high cervical hemisection in rats. *Exp Neurol*, 211, 97-106.
- FULLER, D. D., DOUGHERTY, B. J., SANDHU, M. S., DOPERALSKI, N. J., REYNOLDS, C. R. & HAYWARD, L. F. (2009) Prenatal nicotine exposure alters respiratory long-term facilitation in neonatal rats. *Respir Physiol Neurobiol*, 169, 333-7.
- FULLER, D. D., GOLDER, F. J., OLSON, E. B., JR. & MITCHELL, G. S. (2006) Recovery of phrenic activity and ventilation after cervical spinal hemisection in rats. *J Appl Physiol*, 100, 800-6.
- FULOP, M., BOCK, J., BEN-EZRA, J., ANTONY, M., DANZIG, J. & GAGE, J. S. (1986) Plasma lactate and 3-hydroxybutyrate levels in patients with acute ethanol intoxication. *Am J Med*, 80, 191-4.
- FUNG, H. L., TSOU, P. S., BULITTA, J. B., TRAN, D. C., PAGE, N. A., SODA, D. & MI FUNG, S. (2008) Pharmacokinetics of 1,4-butanediol in rats: bioactivation to gamma-hydroxybutyric acid, interaction with ethanol, and oral bioavailability. *AAPS J*, 10, 56-69.
- FUNK, G. D. & FELDMAN, J. L. (1995) Generation of respiratory rhythm and pattern in mammals: insights from developmental studies. *Curr Opin Neurobiol*, 5, 778-85.
- GAGNAIRE, F., MARIGNAC, B., HECHT, G. & HERY, M. (2002) Sensory irritation of acetic acid, hydrogen peroxide, peroxyacetic acid and their mixture in mice. *Ann Occup Hyg*, 46, 97-102.
- GALLAHER, E. J. & EGNER, D. A. (1985) Ethanol induced temperature disturbances measured by automated radiotelemetry. *Proc West Pharmacol Soc*, 28, 221-3.
- GANAPATHY, V., THANGARAJU, M., GOPAL, E., MARTIN, P. M., ITAGAKI, S., MIYAUCHI, S. & PRASAD, P. D. (2008) Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J*, 10, 193-9.
- GILL, E. W. (1976) The effects of cannabinoids and other CNS depressants on cell membrane models. *Ann N Y Acad Sci*, 281, 151-61.
- GILLIAM, D. M. & COLLINS, A. C. (1982) Acute ethanol effects on blood pH, PCO₂, and PO₂ in LS and SS mice. *Physiol Behav*, 28, 879-83.
- GILLIAM, D. M. & COLLINS, A. C. (1983) Differential effects of ethanol concentration on blood pH, PCO₂ and PO₂ in LS and SS mice. *Physiol Behav*, 30, 295-300.
- GILLIAM, D. M., PHILLIPS, T. J. & DUDEK, B. C. (1985) A comparison of ethanol absorption and narcosis in long- and short-sleep mice following intraperitoneal or intragastric ethanol administration. *Alcohol*, 2, 655-8.

- GOBAILLE, S., HECHLER, V., ANDRIAMAMPANDRY, C., KEMMEL, V. & MAITRE, M. (1999) gamma-Hydroxybutyrate modulates synthesis and extracellular concentration of gamma-aminobutyric acid in discrete rat brain regions in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 290, 303-9.
- GOBATTO, C. A., DE MELLO, M. A., SIBUYA, C. Y., DE AZEVEDO, J. R., DOS SANTOS, L. A. & KOKUBUN, E. (2001) Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 130, 21-7.
- GOINEAU, S., ROMPION, S., GUILLAUME, P. & PICARD, S. (2010) Ventilatory function assessment in safety pharmacology: optimization of rodent studies using normocapnic or hypercapnic conditions. *Toxicol Appl Pharmacol*, 247, 191-7.
- GRAHAM, J. D. & LI, D. M. (1973) Cardiovascular and respiratory effects of cannabis in cat and rat. *Br J Pharmacol*, 49, 1-10.
- GROBIN, A. C., MATTHEWS, D. B., DEVAUD, L. L. & MORROW, A. L. (1998) The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology (Berl)*, 139, 2-19.
- GROMYSZ, H., KARCZEWSKI, W. A., NASLONSKA, E. & ROMANIUK, J. R. (1980) The role of timing and magnitude of the vagal input in controlling the phrenic output in rabbits and baboons. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 40, 563-74.
- GUEYE, P. N., BORRON, S. W., RISEDE, P., MONIER, C., BUNEAUX, F., DEBRAY, M. & BAUD, F. J. (2001) Lack of effect of single high doses of buprenorphine on arterial blood gases in the rat. *Toxicol Sci*, 62, 148-54.
- GUEYE, P. N., BORRON, S. W., RISEDE, P., MONIER, C., BUNEAUX, F., DEBRAY, M. & BAUD, F. J. (2002) Buprenorphine and midazolam act in combination to depress respiration in rats. *Toxicol Sci*, 65, 107-14.
- HAGGARD, H. W., GREENBERG, L. A. & RAKIETEN, N. (1940) Studies on the absorption, distribution and elimination of alcohol VI. The principles governing the concentration of alcohol in the blood and the concentration causing respiratory flaiure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 69, 252-265.
- HAJI, A. & TAKEDA, R. (1987) Depression of respiratory-related nerve activities by ethanol and diazepam. *Arukuru Kenkyuto Yakubutsu Ison*, 22, 224-33.
- HALESTRAP, A. P. & MEREDITH, D. (2004) The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch*, 447, 619-28.
- HALLER, C., THAI, D., JACOB, P., 3RD & DYER, J. E. (2006) GHB urine concentrations after single-dose administration in humans. *J Anal Toxicol*, 30, 360-4.
- HARRIS, L. S. (1971) General and behavioral pharmacology. *Pharmacol Rev*, 23, 285-294.
- HAWKINS, R. D. & KALANT, H. (1972) The metabolism of ethanol and its metabolic effects. *Pharmacol Rev*, 24, 67-157.
- HAYAKAWA, K., MISHIMA, K., HAZEKAWA, M., SANO, K., IRIE, K., ORITO, K., EGAWA, T., KITAMURA, Y., UCHIDA, N., NISHIMURA, R., EGASHIRA, N., IWASAKI, K. & FUJIWARA, M. (2008) Cannabidiol potentiates pharmacological

- effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol via CB(1) receptor-dependent mechanism. *Brain Res*, 1188, 157-64.
- HECHLER, V., RATOMPONIRINA, C. & MAITRE, M. (1997) gamma-Hydroxybutyrate conversion into GABA induces displacement of GABAB binding that is blocked by valproate and ethosuximide. *J Pharmacol Exp Ther*, 281, 753-60.
- HELLSTROM, E. & TOTTMAR, O. (1982) Acute effects of ethanol and acetaldehyde on blood pressure and heart rate in disulfiram-treated and control rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 17, 1103-9.
- HIGGINS, H. L. (1917) Effect of alcohol on the respiration and the gaseous metabolism in man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 9, 441-472.
- HILLEBRAND, J., OLSZEWSKI, D. & SEDEFOV, R. (2008) *GHB and its precursor GBL: an emerging trend case study*, Lisbon, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
- HITCHCOCK, F. (1942) Alterations in respiration caused by alcohol. *Q J Stud Alcohol*, 2, 641-60.
- HOLLISTER, L. E. (1976) Interactions of delta9-tetrahydrocannabinol with other drugs. *Ann N Y Acad Sci*, 281, 212-218.
- HORNER, R. L. (2011) The tongue and its control by sleep state-dependent modulators. *Arch Ital Biol*, 149, 406-25.
- HOUBE, P., MAGER, D. E., RISEDE, P. & BAUD, F. J. (2010) Pharmacokinetics and toxicodynamics of pralidoxime effects on paraoxon-induced respiratory toxicity. *Toxicol Sci*, 116, 660-72.
- HOUBE, P., PRONZOLA, L., KAYOUKA, M., VILLA, A., DEBRAY, M. & BAUD, F. J. (2008) Ventilatory effects of low-dose paraoxon result from central muscarinic effects. *Toxicol Appl Pharmacol*, 233, 186-92.
- HOWLETT, A. C., BARTH, F., BONNER, T. I., CABRAL, G., CASELLAS, P., DEVANE, W. A., FELDER, C. C., HERKENHAM, M., MACKIE, K., MARTIN, B. R., MECHOULAM, R. & PERTWEE, R. G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54, 161-202.
- HUESTIS, M. A. (2007) Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers*, 4, 1770-804.
- HUGHES, K., QUIGG, Z., BELLIS, M. A., VAN HASSELT, N., CALAFAT, A., KOSIR, M., JUAN, M., DUCH, M. & VOORHAM, L. (2011) Drinking behaviours and blood alcohol concentration in four European drinking environments: a cross-sectional study. *BMC Public Health*, 11, 918.
- HUTTUNEN, P., LAPINLAMPI, T. & MYERS, R. D. (1988) Temperature-related release of serotonin from unrestrained rats' pre-optic area perfused with ethanol. *Alcohol*, 5, 189-93.
- HUTTUNEN, P. & MYERS, R. D. (1985) Release of norepinephrine from the rat's hypothalamus perfused with alcohol: relation to body temperature. *Alcohol*, 2, 683-91.
- HUTTUNEN, P., SAMPI, M. & MYLLYLA, R. (1998) Ethanol-induced hypothermia and thermogenesis of brown adipose tissue in the rat. *Alcohol*, 15, 315-8.

- INGELS, M., RANGAN, C., BELLEZZO, J. & CLARK, R. F. (2000) Coma and respiratory depression following the ingestion of GHB and its precursors: three cases. *J Emerg Med*, 19, 47-50.
- INOUE, K., FUKUNAGA, M., KIRIYAMA, T. & KOMURA, S. (1984) Accumulation of acetaldehyde in alcohol-sensitive Japanese: relation to ethanol and acetaldehyde oxidizing capacity. *Alcohol Clin Exp Res*, 8, 319-22.
- IVES, R. & GHELANIE, P. (2003) Polyconsommation de drogues - la consommation combinée de drogues. *Conférence ministérielle du groupe Pompidou*. Dublin.
- JACOBSEN, E. (1952) The metabolism of ethyl alcohol. *Pharmacol Rev*, 4, 107-35.
- JACOBSON, L. H., BETTLER, B., KAUPMANN, K. & CRYAN, J. F. (2006) GABAB1 receptor subunit isoforms exert a differential influence on baseline but not GABAB receptor agonist-induced changes in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 319, 1317-26.
- JODKOWSKI, J. S., COLES, S. K. & DICK, T. E. (1994) A 'pneumotaxic centre' in rats. *Neurosci Lett*, 172, 67-72.
- JODKOWSKI, J. S., COLES, S. K. & DICK, T. E. (1997) Prolongation in expiration evoked from ventrolateral pons of adult rats. *J Appl Physiol*, 82, 377-81.
- JOHNSTON, G. A. (1996) GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther*, 69, 173-98.
- JOHNSTONE, R. E., LIEF, P. L., KULP, R. A. & SMITH, T. C. (1975) Combination of delta9-tetrahydrocannabinol with oxymorphone or pentobarbital: Effects on ventilatory control and cardiovascular dynamics. *Anesthesiology*, 42, 674-684.
- JOHNSTONE, R. E. & REIER, C. E. (1973) Acute respiratory effects of ethanol in man. *Clin Pharmacol Ther*, 14, 501-8.
- JOHNSTONE, R. E. & WITT, R. L. (1972) Respiratory effects of ethyl alcohol intoxication. *JAMA*, 222, 486.
- JONES, A. W. (1993) Pharmacokinetics of ethanol in saliva: comparison with blood and breath alcohol profiles, subjective feelings of intoxication, and diminished performance. *Clin Chem*, 39, 1837-44.
- JONES, A. W. (2000) Aspects of in-vivo pharmacokinetics of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 24, 400-2.
- JONES, A. W., EKLUND, A. & KRONSTRAND, R. (2009) Concentration-time profiles of gamma-hydroxybutyrate in blood after recreational doses are best described by zero-order rather than first-order kinetics. *J Anal Toxicol*, 33, 332-5.
- JONES, A. W., HOLMGREN, A. & KUGELBERG, F. C. (2007) Gamma-hydroxybutyrate concentrations in the blood of impaired drivers, users of illicit drugs, and medical examiner cases. *J Anal Toxicol*, 31, 566-72.
- JONES, A. W., JONSSON, K. A. & JORFELDT, L. (1989) Differences between capillary and venous blood-alcohol concentrations as a function of time after drinking, with emphasis on sampling variations in left vs right arm. *Clin Chem*, 35, 400-4.
- JONES, A. W., LINDBERG, L. & OLSSON, S. G. (2004) Magnitude and time-course of arterio-venous differences in blood-alcohol concentration in healthy men. *Clin Pharmacokinet*, 43, 1157-66.

- JONES, A. W., NORBERG, A. & HAHN, R. G. (1997) Concentration-time profiles of ethanol in arterial and venous blood and end-expired breath during and after intravenous infusion. *J Forensic Sci*, 42, 1088-94.
- JORDAN, C. (1982) Assessment of the effects of drugs on respiration. *Br J Anaesth*, 54, 763-82.
- JUHLIN-DANNFELT, A. (1977) Ethanol effects of substrate utilization by the human brain. *Scand J Clin Lab Invest*, 37, 443-9.
- KALANT, H. (1996) Pharmacokinetics of ethanol: absorption, distribution, and elimination. IN BEGLEITER, H. & KISSIN, B. (Eds.) *The pharmacology of alcohol and alcohol dependence*. Oxford, Oxford University Press.
- KALANT, H. & LE, A. D. (1983) Effects of ethanol on thermoregulation. *Pharmacol Ther*, 23, 313-64.
- KARKOULIAS, K., TSITSARAS, H., PATOUCHAS, D., SAMPSONAS, F., LIKOURAS, D., KAPARIANOS, A. & SPIROPOULOS, K. (2008) The alcoholic lung disease: historical background and clinical features. *Medicina (Kaunas)*, 44, 651-64.
- KARSCHNER, E. L., DARWIN, W. D., GOODWIN, R. S., WRIGHT, S. & HUESTIS, M. A. (2011) Plasma cannabinoid pharmacokinetics following controlled oral delta9-tetrahydrocannabinol and oromucosal cannabis extract administration. *Clin Chem*, 57, 66-75.
- KAUFMAN, E. E. & NELSON, T. (1981) Kinetics of coupled gamma-hydroxybutyrate oxidation and D-glucuronate reduction by an NADP+-dependent oxidoreductase. *J Biol Chem*, 256, 6890-4.
- KAUFMAN, E. E. & NELSON, T. (1987) Evidence for the participation of a cytosolic NADP+-dependent oxidoreductase in the catabolism of gamma-hydroxybutyrate in vivo. *J Neurochem*, 48, 1935-41.
- KAUFMAN, E. E. & NELSON, T. (1991) An overview of gamma-hydroxybutyrate catabolism: the role of the cytosolic NADP(+)-dependent oxidoreductase EC 1.1.1.19 and of a mitochondrial hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase in the initial, rate-limiting step in this pathway. *Neurochem Res*, 16, 965-74.
- KAUFMAN, E. E., PORRINO, L. J. & NELSON, T. (1990) Pyretic action of low doses of gamma-hydroxybutyrate in rats. *Biochem Pharmacol*, 40, 2637-40.
- KAUPMANN, K., CRYAN, J. F., WELLENDORPH, P., MOMBЕРЕАU, C., SANSIG, G., KLEBS, K., SCHMUTZ, M., FROESTL, W., VAN DER PUTTEN, H., MOSBACHER, J., BRAUNER-OSBORNE, H., WALDMEIER, P. & BETTLER, B. (2003) Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA(B)(1)-deficient mice. *Eur J Neurosci*, 18, 2722-30.
- KAYE, S. & HAAG, H. B. (1957) Terminal blood alcohol concentrations in ninety-four fatal cases of acute alcoholism. *J Am Med Assoc*, 165, 451-2.
- KELLY, S. J., BONTIUS, D. J. & WEST, J. R. (1987) Developmental changes in alcohol pharmacokinetics in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 11, 281-6.

- KERVERN, M., DUBOIS, C., NAASSILA, M., DAOUST, M. & PIERREFICHE, O. (2009) Perinatal alcohol exposure in rat induces long-term depression of respiration after episodic hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med*, 179, 608-14.
- KETTUNEN, R., TIMISJARVI, J., SAUKKO, P. & KOSKELA, M. (1983) Influence of ethanol on systemic and pulmonary hemodynamics in anesthetized dogs. *Acta Physiol Scand*, 118, 209-14.
- KIMURA, E. T., EBERT, D. M. & DODGE, P. W. (1971) Acute toxicity and limits of solvent residue for sixteen organic solvents. *Toxicol Appl Pharmacol*, 19, 699-704.
- KINKEAD, R., MONTANDON, G., BAIRAM, A., LAJEUNESSE, Y. & HORNER, R. (2009) Neonatal maternal separation disrupts regulation of sleep and breathing in adult male rats. *Sleep*, 32, 1611-20.
- KINTZ, P., VILLAIN, M., PELISSIER, A. L., CIRIMELE, V. & LEONETTI, G. (2005) Unusually high concentrations in a fatal GHB case. *J Anal Toxicol*, 29, 582-5.
- KIPLINGER, G. F. & MANNO, J. E. (1971) Dose-response relationships to cannabis in human subjects. *Pharmacol Rev*, 23, 339-347.
- KIRKNESS, J. P., KRISHNAN, V., PATIL, S. P. & SCHNEIDER, H. (2006) Upper airway obstruction in snoring and upper airway resistance syndrome. IN RANDEATH, W. J., SANNER, B. M. & SOMERS, V. K. (Eds.) *Sleep apnea: current diagnosis and treatment*. Basel, Karger.
- KLEIN, C., KARANGES, E., SPIRO, A., WONG, A., SPENCER, J., HUYNH, T., GUNASEKARAN, N., KARL, T., LONG, L. E., HUANG, X. F., LIU, K., ARNOLD, J. C. & MCGREGOR, I. S. (2011) Cannabidiol potentiates Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) behavioural effects and alters THC pharmacokinetics during acute and chronic treatment in adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 218, 443-57.
- KLINGMAN, G. I., HAAG, H. B. & BANE, R. (1958) Studies on severe alcohol intoxication in dogs. II. Mechanisms involved in the production of hyperglycemia, hypokalemia and hemoconcentration. *Q J Stud Alcohol*, 19, 543-52.
- KNUDSEN, K., JONSSON, U. & ABRAHAMSSON, J. (2010) Twenty-three deaths with gamma-hydroxybutyrate overdose in western Sweden between 2000 and 2007. *Acta Anaesthesiol Scand*, 54, 987-92.
- KOEK, W., FRANCE, C. P., CHENG, K. & RICE, K. C. (2010) GABAB receptor-positive modulators: enhancement of GABAB receptor agonist effects in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 335, 163-71.
- KOLESNIKOVA, E. (2011) Role of Glutamate and GABA in Mechanisms Underlying Respiratory Control. *Neurophysiology*, 42, 294-304.
- KOREN, G., BARKER, C., BOHN, D., KENT, G., MCGUIGAN, M. & BIGGAR, D. (1989) Effect of hypothermia on the pharmacokinetics of ethanol in piglets. *Ann Emerg Med*, 18, 118-21.
- KOZAWA, S., YUKAWA, N., LIU, J., SHIMAMOTO, A., KAKIZAKI, E. & FUJIMIYA, T. (2007) Effect of chronic ethanol administration on disposition of ethanol and its metabolites in rat. *Alcohol*, 41, 87-93.

- KRARUP, N. & LARSEN, J. A. (1972) The effect of slight hypothermia on liver function as measured by the elimination rate of ethanol, the hepatic uptake and excretion of indocyanine green and bile formation. *Acta Physiol Scand*, 84, 396-407.
- KRAUT, J. A. & KURTZ, I. (2008) Toxic alcohol ingestions: clinical features, diagnosis, and management. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3, 208-25.
- KREBS, H. A. (1968) The effects of ethanol on the metabolic activities of the liver. *Adv Enzyme Regul*, 6, 467-80.
- KREISBERG, R. A., OWEN, W. C. & SIEGAL, A. M. (1971a) Ethanol-induced hyperlactacidemia: inhibition of lactate utilization. *J Clin Invest*, 50, 166-74.
- KREISBERG, R. A., SIEGAL, A. M. & OWEN, W. C. (1971b) Glucose-lactate interrelationships: effect of ethanol. *J Clin Invest*, 50, 175-85.
- KRUMPE, P. E., CUMMISKEY, J. M. & LILLINGTON, G. A. (1984) Alcohol and the respiratory tract. *Med Clin North Am*, 68, 201-19.
- KUGELBERG, F. C., HOLMGREN, A., EKLUND, A. & JONES, A. W. (2010) Forensic toxicology findings in deaths involving gamma-hydroxybutyrate. *Int J Legal Med*, 124, 1-6.
- LABORIT, H. (1964) Sodium 4-Hydroxybutyrate. *Int J Neuropharmacol*, 3, 433-51.
- LABORIT, H., JOUANY, J. M., GERARD, J. & FABIANI, F. (1960) [Summary of an experimental and clinical study on a metabolic substrate with inhibitory central action: sodium 4-hydroxybutyrate]. *Presse Med*, 68, 1867-9.
- LAKE, K. D., MARTIN, B. R., KUNOS, G. & VARGA, K. (1997) Cardiovascular effects of anandamide in anesthetized and conscious normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*, 29, 1204-1210.
- LALLEY, P. M. (1983) Biphasic effects of baclofen on phrenic motoneurons: possible involvement of two types of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 226, 616-24.
- LALLEY, P. M. (1986) Effects of baclofen and gamma-aminobutyric acid on different types of medullary respiratory neurons. *Brain Res*, 376, 392-5.
- LAM, W. K., FELMLEE, M. A. & MORRIS, M. E. (2010) Monocarboxylate transporter-mediated transport of gamma-hydroxybutyric acid in human intestinal Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos*, 38, 441-7.
- LAMIABLE, D., HOIZEY, G., MARTY, H. & VISTELLE, R. (2000) Intoxication aiguë à l'éthanol. *Revue Française des Laboratoires*, 2000, 27-30.
- LANGE, P. (2007) Cannabis and the lung. *Thorax*, 62, 1036-7.
- LARSEN, J. A. (1971) The effect of cooling on liver function in cats. *Acta Physiol Scand*, 81, 197-207.
- LEMOS, J. I., TAKAHASHI, R. N. & MORATO, G. S. (2007) Effects of SR141716 and WIN 55,212-2 on tolerance to ethanol in rats using the acute and rapid procedures. *Psychopharmacology (Berl)*, 194, 139-149.
- LEON, L. R., WALKER, L. D., DUBOSE, D. A. & STEPHENSON, L. A. (2004) Biotelemetry transmitter implantation in rodents: impact on growth and circadian rhythms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286, R967-74.

- LETTIERI, J. & FUNG, H. L. (1976) Absorption and first-pass metabolism of ¹⁴C-gamma-hydroxybutyric acid. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 13, 425-37.
- LETTIERI, J. & FUNG, H. L. (1978) Improved pharmacological activity via pro-drug modification: comparative pharmacokinetics of sodium gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 22, 107-18.
- LETTIERI, J. T. & FUNG, H. L. (1979) Dose-dependent pharmacokinetics and hypnotic effects of sodium gamma-hydroxybutyrate in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 208, 7-11.
- LI, D. M. (1973) Cardiovascular and respiratory effects of cannabis extracts and 1-tetrahydrocannabinol (1-THC). *Br J Pharmacol*, 47, 627P.
- LI, J., STOKES, S. A. & WOECKENER, A. (1998) A tale of novel intoxication: seven cases of gamma-hydroxybutyric acid overdose. *Ann Emerg Med*, 31, 723-8.
- LI, Q., YAN, H., WILSON, W. A. & SWARTZWELDER, H. S. (2010) Modulation of NMDA and AMPA-mediated synaptic transmission by CB1 receptors in frontal cortical pyramidal cells. *Brain Res*, 1342, 127-37.
- LICHTMAN, A. H., POKLIS, J. L., POKLIS, A., WILSON, D. M. & MARTIN, B. R. (2001) The pharmacological activity of inhalation exposure to marijuana smoke in mice. *Drug Alcohol Depend*, 63, 107-116.
- LIEBER, C. S. (1975) Interference of ethanol in hepatic cellular metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 252, 24-50.
- LIECHTI, M. E., KUNZ, I., GREMINGER, P., SPEICH, R. & KUPFERSCHMIDT, H. (2006) Clinical features of gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone toxicity and concomitant drug and alcohol use. *Drug Alcohol Depend*, 81, 323-6.
- LIECHTI, M. E. & KUPFERSCHMIDT, H. (2004) Gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL): analysis of overdose cases reported to the Swiss Toxicological Information Centre. *Swiss Med Wkly*, 134, 534-7.
- LIEN, D. & MADER, T. J. (1999) Survival from profound alcohol-related lactic acidosis. *J Emerg Med*, 17, 841-6.
- LIGNIAN, H., FONTAINE, J. & ASKENASI, R. (1983) Naloxone and alcohol intoxication in the dog. *Hum Toxicol*, 2, 221-5.
- LIGUORI, A., GATTO, C. P. & JARRETT, D. B. (2002) Separate and combined effects of marijuana and alcohol on mood, equilibrium and simulated driving. *Psychopharmacology (Berl)*, 163, 399-405.
- LIM, R. T., JR., GENTRY, R. T., ITO, D., YOKOYAMA, H., BARAONA, E. & LIEBER, C. S. (1993) First-pass metabolism of ethanol is predominantly gastric. *Alcohol Clin Exp Res*, 17, 1337-44.
- LIN, M. T., CHERN, Y. F., WANG, H. S. & CHANDRA, A. (1979) Effects of gamma-hydroxybutyric acid on metabolic, respiratory and vasomotor activities and body temperature in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 211, 167-70.
- LINAKIS, J. G. & CUNNINGHAM, C. L. (1979) Effects of concentration of ethanol injected intraperitoneally on taste aversion, body temperature, and activity. *Psychopharmacology (Berl)*, 64, 61-5.

- LIU, Q., FEHRING, C., LOWRY, T. F. & WONG-RILEY, M. T. (2009) Postnatal development of metabolic rate during normoxia and acute hypoxia in rats: implication for a sensitive period. *J Appl Physiol*, 106, 1212-22.
- LOMAX, P., BAJOREK, J. G., BAJOREK, T. A. & CHAFFEE, R. R. (1981) Thermoregulatory mechanisms and ethanol hypothermia. *Eur J Pharmacol*, 71, 483-7.
- LOOMIS, T. A. (1952) The effect of alcohol on myocardial and respiratory function; the influence of modified respiratory function on the cardiac toxicity of alcohol. *Q J Stud Alcohol*, 13, 561-70.
- LOPEZ, C. H., CONSTANTIN, J., GIMENES, D., SUZUKI-KEMMELMEIER, F. & BRACHT, A. (2004) Heterogenic response of the liver parenchyma to ethanol studied in the bivascularly perfused rat liver. *Mol Cell Biochem*, 258, 155-62.
- LOPEZ, C. H., SUZUKI-KEMMELMEIER, F., CONSTANTIN, J. & BRACHT, A. (2009) Zonation of the action of ethanol on gluconeogenesis and ketogenesis studied in the bivascularly perfused rat liver. *Chem Biol Interact*, 177, 89-95.
- LUKAS, S. E. & OROZCO, S. (2001) Ethanol increases plasma Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) levels and subjective effects after marihuana smoking in human volunteers. *Drug Alcohol Depend*, 64, 143-149.
- LUND, L. O., HUMPHRIES, J. H. & VIRTUE, R. W. (1965) Sodium gamma hydroxybutyrate: laboratory and clinical studies. *Can Anaesth Soc J*, 12, 379-85.
- LUNDQUIST, F., SESTOFT, L., DAMGAARD, S. E., CLAUSEN, J. P. & TRAP-JENSEN, J. (1973) Utilization of acetate in the human forearm during exercise after ethanol ingestion. *J Clin Invest*, 52, 3231-5.
- LUNDQUIST, F., TYGSTRUP, N., WINKLER, K., MELLEMGAAARD, K. & MUNCK-PETERSEN, S. (1962) Ethanol metabolism and production of free acetate in the human liver. *J Clin Invest*, 41, 955-61.
- MACDONALD, L., KRUSE, J. A., LEVY, D. B., MARULENDRA, S. & SWEENEY, P. J. (1994) Lactic acidosis and acute ethanol intoxication. *Am J Emerg Med*, 12, 32-5.
- MACGREGOR, D. C., SCHOENBAUM, E. & BIGELOW, W. G. (1965) Effects Of Hypothermia On Disappearance Of Ethanol From Arterial Blood. *Am J Physiol*, 208, 1016-20.
- MACKIE, K. (2008) Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1, 10-4.
- MAITRE, M. (1997) The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol*, 51, 337-61.
- MAITRE, M., HUMBERT, J. P., KEMMEL, V., AUNIS, D. & ANDRIAMAMPANDRY, C. (2005) [A mechanism for gamma-hydroxybutyrate (GHB) as a drug and a substance of abuse]. *Med Sci (Paris)*, 21, 284-9.
- MAKAR, A. B. & MANNERING, G. J. (1970) Kinetics of ethanol metabolism in the intact rat and monkey. *Biochem Pharmacol*, 19, 2017-22.
- MALIT, L. A., JOHNSTONE, R. E., BOURKE, D. I., KULP, R. A., KLEIN, V. & SMITH, T. C. (1975) Intravenous delta9-Tetrahydrocannabinol: Effects of ventilatory control and cardiovascular dynamics. *Anesthesiology*, 42, 666-673.

- MALONE, D. T. & TAYLOR, D. A. (1998) Modulation of delta9-tetrahydrocannabinol-induced hypothermia by fluoxetine in the rat. *Br J Pharmacol*, 124, 1419-24.
- MALONE, D. T. & TAYLOR, D. A. (2001) Involvement of somatodendritic 5-HT(1A) receptors in Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced hypothermia in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 69, 595-601.
- MANCHADO FDE, B., GOBATTO, C. A., VOLTARELLI, F. A. & ROSTOM DE MELLO, M. A. (2006) Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl Physiol Nutr Metab*, 31, 731-6.
- MANNO, J. E., KIPLINGER, G. F., SCHOLZ, N. & FORNEY, R. B. (1971) The influence of alcohol and marihuana on motor and mental performance. *Clin Pharmacol Ther*, 12, 202-11.
- MARSHALL, F. H., JONES, K. A., KAUPMANN, K. & BETTLER, B. (1999) GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 396-9.
- MARTIN, E., MOLL, W., SCHMID, P. & DETTLI, L. (1984) The pharmacokinetics of alcohol in human breath, venous and arterial blood after oral ingestion. *Eur J Clin Pharmacol*, 26, 619-26.
- MARTIN, P. M., GOPAL, E., ANANTH, S., ZHUANG, L., ITAGAKI, S., PRASAD, B. M., SMITH, S. B., PRASAD, P. D. & GANAPATHY, V. (2006) Identity of SMCT1 (SLC5A8) as a neuron-specific Na⁺-coupled transporter for active uptake of L-lactate and ketone bodies in the brain. *J Neurochem*, 98, 279-88.
- MASON, P. E. & KERNS, W. P., 2ND (2002) Gamma hydroxybutyric acid (GHB) intoxication. *Acad Emerg Med*, 9, 730-9.
- MASSON, S., DESMOULIN, F., SCIACKY, M. & COZZONE, P. J. (1992) The effects of ethanol concentration on glycerol-3-phosphate accumulation in the perfused rat liver. A reassessment of ethanol-induced inhibition of glycolysis using ³¹P-NMR spectroscopy and HPLC. *Eur J Biochem*, 205, 187-94.
- MATSUMOTO, H. & FUKUI, Y. (2002) Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. *Addict Biol*, 7, 5-14.
- MAZARR-PROO, S. & KERRIGAN, S. (2005) Distribution of GHB in tissues and fluids following a fatal overdose. *J Anal Toxicol*, 29, 398-400.
- MCCABE, E. R., LAYNE, E. C., SAYLER, D. F., SLUSHER, N. & BESSMAN, S. P. (1971) Synergy of ethanol and a natural soporific--gamma hydroxybutyrate. *Science*, 171, 404-6.
- MCCMAHON, L. R. & KOEK, W. (2007) Differences in the relative potency of SR 141716A and AM 251 as antagonists of various in vivo effects of cannabinoid agonists in C57BL/6J mice. *Eur J Pharmacol*, 569, 70-6.
- MEERLO, P., WESTERVELD, P., TUREK, F. W. & KOEHL, M. (2004) Effects of gamma-hydroxybutyrate (GHB) on vigilance states and EEG in mice. *Sleep*, 27, 899-904.
- MEGARBANE, B., LESGUILLONS, N., GALLIOT-GUILLEY, M., BORRON, S. W., TROUT, H., DECLEVES, X., RISEDE, P., MONIER, C., BOSCHI, G. & BAUD, F. J. (2005a) Cerebral and plasma kinetics of a high dose of midazolam and correlations with its respiratory effects in rats. *Toxicol Lett*, 159, 22-31.

- MEGARBANE, B., MARIE, N., PIRNAY, S., BORRON, S. W., GUEYE, P. N., RISEDE, P., MONIER, C., NOBLE, F. & BAUD, F. J. (2006) Buprenorphine is protective against the depressive effects of norbuprenorphine on ventilation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 212, 256-67.
- MEGARBANE, B., PIRNAY, S., BORRON, S. W., TROUT, H., MONIER, C., RISEDE, P., BOSCHI, G. & BAUD, F. J. (2005b) Flunitrazepam does not alter cerebral distribution of buprenorphine in the rat. *Toxicol Lett*, 157, 211-9.
- MEZEY, E. (1976) Ethanol metabolism and ethanol-drug interactions. *Biochem Pharmacol*, 25, 869-75.
- MIRO, O., NOGUE, S., ESPINOSA, G., TO-FIGUERAS, J. & SANCHEZ, M. (2002) Trends in illicit drug emergencies: the emerging role of gamma-hydroxybutyrate. *J Toxicol Clin Toxicol*, 40, 129-35.
- MONTANDON, G., KINKEAD, R. & BAIRAM, A. (2007) Disruption of adenosinergic modulation of ventilation at rest and during hypercapnia by neonatal caffeine in young rats: role of adenosine A(1) and A(2A) receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292, R1621-31.
- MORRIS, M. E. & FELMLEE, M. A. (2008) Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid. *AAPS J*, 10, 311-21.
- MORRIS, M. E., HU, K. & WANG, Q. (2005) Renal clearance of gamma-hydroxybutyric acid in rats: increasing renal elimination as a detoxification strategy. *J Pharmacol Exp Ther*, 313, 1194-202.
- MORRISON, S. F., CRAVO, S. L. & WILFEHRT, H. M. (1994) Pontine lesions produce apneusis in the rat. *Brain Res*, 652, 83-6.
- MORROW, A. L., VANDOREN, M. J., FLEMING, R. & PENLAND, S. (2001) Ethanol and neurosteroid interactions in the brain. *Int Rev Neurobiol*, 46, 349-77.
- MORSE, B. L., FELMLEE, M. A. & MORRIS, M. E. (2012a) gamma-Hydroxybutyrate blood/plasma partitioning: effect of physiologic pH on transport by monocarboxylate transporters. *Drug Metab Dispos*, 40, 64-9.
- MORSE, B. L., UHLANDER, J. & MORRIS, M. E. (2011) Respiratory Depression in γ -Hydroxybutyrate Overdose: Interaction with Ethanol and Treatment using Monocarboxylate Transporter Inhibition. *2011 AAPS Annual Meeting*. Washington D.C.
- MORSE, B. L., VIJAY, N. & MORRIS, M. E. (2012b) Gamma-hydroxybutyrate (GHB)-induced respiratory depression: combined receptor-transporter inhibition therapy for treatment in GHB overdose. *Mol Pharmacol*, 82, 226-35.
- MORTENSEN, B. & DALE, O. (1995) Effects of hypothermia on the elimination of ethanol, diazepam and oxazepam in rat liver slice incubations. *Acta Anaesthesiol Scand*, 39, 199-204.
- MOSER, V. C. & BALSTER, R. L. (1985) Effects of toluene, halothane and ethanol vapor on fixed-ratio performance in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 22, 797-802.

- MURPHY, M. T. & LIPTON, J. M. (1983) Effects of alcohol on thermoregulation in aged monkeys. *Exp Gerontol*, 18, 19-27.
- MURRAY, K. A., WHITE, W. J. & ZAGON, I. S. (1986) Ethanol exposure in rats: studies on blood gas concentrations, pH and temperature. *Alcohol*, 3, 5-10.
- MYERS, R. D. (1981) Alcohol's effect on body temperature: hypothermia, hyperthermia or poikilothermia? *Brain Res Bull*, 7, 209-20.
- NADULSKI, T., SPORKERT, F., SCHNELLE, M., STADELMANN, A. M., ROSER, P., SCHEFTER, T. & PRAGST, F. (2005) Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract. *J Anal Toxicol*, 29, 782-9.
- NARIMATSU, S., WATANABE, K., MATSUNAGA, T., YAMAMOTO, I., IMAOKA, S., FUNAE, Y. & YOSHIMURA, H. (1990) Cytochrome P-450 isozymes in metabolic activation of delta 9-tetrahydrocannabinol by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 18, 943-8.
- NASRALLAH, F. A., MAHER, A. D., HANRAHAN, J. R., BALCAR, V. J. & RAE, C. D. (2010) gamma-Hydroxybutyrate and the GABAergic footprint: a metabolomic approach to unpicking the actions of GHB. *J Neurochem*, 115, 58-67.
- NAVA, F., CARTA, G., BATTASI, A. M. & GESSA, G. L. (2000) D(2) dopamine receptors enable delta(9)-tetrahydrocannabinol induced memory impairment and reduction of hippocampal extracellular acetylcholine concentration. *Br J Pharmacol*, 130, 1201-1210.
- NETTLETON, R. T., RANSOM, T. A., ABRAHAM, S. L., NELSON, C. S. & OLSEN, G. D. (2007) Methadone-induced respiratory depression in the neonatal guinea pig. *Pediatr Pulmonol*, 42, 1134-43.
- NIANE, L., JOSEPH, V. & BAIRAM, A. (2009) Role of cholinergic-nicotinic receptors on hypoxic chemoreflex during postnatal development in rats. *Respir Physiol Neurobiol*, 169, 323-32.
- NICHOLAS, P. C., KIM, D., CREWS, F. T. & MACDONALD, J. M. (2008) 1H NMR-based metabolomic analysis of liver, serum, and brain following ethanol administration in rats. *Chem Res Toxicol*, 21, 408-20.
- NIELSEN, G. D. & ALARIE, Y. (1982) Sensory irritation, pulmonary irritation, and respiratory stimulation by airborne benzene and alkylbenzenes: prediction of safe industrial exposure levels and correlation with their thermodynamic properties. *Toxicol Appl Pharmacol*, 65, 459-77.
- NUTT, D. J. & PETERS, T. J. (1994) Alcohol: the drug. *Br Med Bull*, 50, 5-17.
- OFDT (2005a) Cannabis. *Drogues et dépendances, données essentielles*. La découverte ed. Paris, Observatoire français des drogues et des toxicomanies (OFDT).
- OFDT (2005b) Polyconsommation. *Drogues et dépendances, données essentielles*. La découverte ed. Paris, Observatoire français des drogues et des toxicomanies (OFDT).
- OGILVIE, K., LEE, S. & RIVIER, C. (1997) Effect of three different modes of alcohol administration on the activity of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Alcohol Clin Exp Res*, 21, 467-76.

- OKUN, M. S., BOOTHBY, L. A., BARTFIELD, R. B. & DOERING, P. L. (2001) GHB: an important pharmacologic and clinical update. *J Pharm Pharm Sci*, 4, 167-75.
- OLSEN, R. W., CHANG, C. S., LI, G., HANCHAR, H. J. & WALLNER, M. (2004) Fishing for allosteric sites on GABA(A) receptors. *Biochem Pharmacol*, 68, 1675-84.
- OLSON, G. A., OLSON, R. D. & KASTIN, A. J. (1984) Endogenous opiates: 1983. *Peptides*, 5, 975-92.
- PADLEY, J. R., LI, Q., PILOWSKY, P. M. & GOODCHILD, A. K. (2003) Cannabinoid receptor activation in the rostral ventrolateral medulla oblongata evokes cardiorespiratory effects in anaesthetised rats. *Br J Pharmacol*, 140, 384-394.
- PAGALA, M., RAVINDRAN, K., AMALADEVI, B., NAMBA, T. & GROB, D. (1995) Effect of ethanol on function of the rat heart and skeletal muscles. *Alcohol Clin Exp Res*, 19, 676-84.
- PAGE, R. A., KITSON, K. E. & HARDMAN, M. J. (1991) The importance of alcohol dehydrogenase in regulation of ethanol metabolism in rat liver cells. *Biochem J*, 278 (Pt 3), 659-65.
- PALATINI, P., TEDESCHI, L., FRISON, G., PADRINI, R., ZORDAN, R., ORLANDO, R., GALLIMBERTI, L., GESSA, G. L. & FERRARA, S. D. (1993) Dose-dependent absorption and elimination of gamma-hydroxybutyric acid in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, 45, 353-6.
- PASTINO, G. M., ASGHARIAN, B., ROBERTS, K., MEDINSKY, M. A. & BOND, J. A. (1997) A comparison of physiologically based pharmacokinetic model predictions and experimental data for inhaled ethanol in male and female B6C3F1 mice, F344 rats, and humans. *Toxicol Appl Pharmacol*, 145, 147-57.
- PASTINO, G. M. & CONOLLY, R. B. (2000) Application of a physiologically based pharmacokinetic model to estimate the bioavailability of ethanol in male rats: distinction between gastric and hepatic pathways of metabolic clearance. *Toxicol Sci*, 55, 256-65.
- PATEL, H. J., BIRRELL, M. A., CRISPINO, N., HELE, D. J., VENKATESAN, P., BARNES, P. J., YACOB, M. H. & BELVISI, M. G. (2003) Inhibition of guinea-pig and human sensory nerve activity and the cough reflex in guinea-pigs by cannabinoid (CB2) receptor activation. *Br J Pharmacol*, 140, 261-8.
- PATON, J. F. & DUTSCHMANN, M. (2002) Central control of upper airway resistance regulating respiratory airflow in mammals. *J Anat*, 201, 319-23.
- PAYNE, J. P., HILL, D. W. & KING, N. W. (1966) Observations on the distribution of alcohol in blood, breath, and urine. *Br Med J*, 1, 196-202.
- PEREZ-REYES, M., HICKS, R. E., BUMBERRY, J., JEFFCOAT, A. R. & COOK, C. E. (1988) Interaction between marijuana and ethanol: effects on psychomotor performance. *Alcohol Clin Exp Res*, 12, 268-276.
- PERIS, J. & CUNNINGHAM, C. L. (1986) Handling-induced enhancement of alcohol's acute physiological effects. *Life Sci*, 38, 273-9.
- PERIS, J. & CUNNINGHAM, C. L. (1987) Stress enhances the development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol. *Alcohol Drug Res*, 7, 187-93.

- PERSSON, S. A., ERIKSSON, A., HALLGREN, N., EKLUND, A., BERKOWICZ, A. & DRUID, H. (2001) [GHB--dangerous, addictive and uncontrollable "party drug"]. *Lakartidningen*, 98, 4026-31, 4033-5.
- PERTWEE, R. G. (2006) Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S163-S171.
- PERTWEE, R. G., GREENTREE, S. G. & SWIFT, P. A. (1988) Drugs which stimulate or facilitate central GABAergic transmission interact synergistically with delta-9-tetrahydrocannabinol to produce marked catalepsy in mice. *Neuropharmacology*, 27, 1265-70.
- PFITZER, T., NIEDERHOFFER, N. & SZABO, B. (2004) Central effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on respiratory and cardiovascular regulation in anaesthetised rats. *Br J Pharmacol*, 142, 943-952.
- PHILLIPS, R. N., BROWN, D. J. & FORNEY, R. B. (1971a) Enhancement of depressant properties of alcohol or barbiturate in combination with aqueous suspended delta 9-tetrahydrocannabinol in rats. *J Forensic Sci*, 16, 152-161.
- PHILLIPS, R. N., TURK, R. F. & FORNEY, R. B. (1971b) Acute toxicity of delta-9-tetrahydrocannabinol in rats and mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 136, 260-3.
- PIERREFICHE, O., FOUTZ, A. S. & DENAVIT-SAUBIE, M. (1993) Effects of GABAB receptor agonists and antagonists on the bulbar respiratory network in cat. *Brain Res*, 605, 77-84.
- PINARD, A., SEDDIK, R. & BETTLER, B. (2010) GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv Pharmacol*, 58, 231-55.
- PIRNAY, S. O., MEGARBANE, B., BORRON, S. W., RISEDE, P., MONIER, C., RICORDEL, I. & BAUD, F. J. (2008) Effects of various combinations of benzodiazepines with buprenorphine on arterial blood gases in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 103, 228-39.
- POHORECKY, L. A. & BRICK, J. (1988) Pharmacology of ethanol. *Pharmacol Ther*, 36, 335-427.
- POKORSKI, M. & ANTOSIEWICZ, J. (2010) Alterations in the hypoxic ventilatory response with advancing age in awake rats. *J Physiol Pharmacol*, 61, 227-32.
- POL, W., KLEIJN, E. & LAUW, M. (1975) Gas chromatographic determination and pharmacokinetics of 4-hydroxybutyrate in dog and mouse. *J Pharmacokinet Biopharm*, 3, 99-113.
- POLDRUGO, F. & ADDOLORATO, G. (1999) The role of gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcoholism: from animal to clinical studies. *Alcohol Alcohol*, 34, 15-24.
- POLDRUGO, F. & SNEAD, O. C., 3RD (1984) Effect of ethanol and acetaldehyde on gamma-hydroxybutyric acid in rat brain and liver. *Subst Alcohol Actions Misuse*, 5, 263-71.
- PRYOR, G. T., LARSEN, F. F., CARR, J. D. & BRAUDE, M. C. (1977) Interactions of delta9-tetrahydrocannabinol with phenobarbital, ethanol and chlordiazepoxide. *Pharmacol Biochem Behav*, 7, 331-45.

- QUEVA, C., BREMNER-DANIELSEN, M., EDLUND, A., EKSTRAND, A. J., ELG, S., ERICKSON, S., JOHANSSON, T., LEHMANN, A. & MATTSSON, J. P. (2003) Effects of GABA agonists on body temperature regulation in GABA(B(1))-/- mice. *Br J Pharmacol*, 140, 315-22.
- QUINN, H. R., MATSUMOTO, I., CALLAGHAN, P. D., LONG, L. E., ARNOLD, J. C., GUNASEKARAN, N., THOMPSON, M. R., DAWSON, B., MALLET, P. E., KASHEM, M. A., MATSUDA-MATSUMOTO, H., IWAZAKI, T. & MCGREGOR, I. S. (2008) Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology*, 33, 1113-26.
- RAEIHAE, N. & MAEENIAEAE, P. (1964) The influence of ethanol on the acid-base balance of the blood in man and rat. *Scand J Clin Lab Invest*, 16, 267-72.
- RAMIREZ, J. M. & RICHTER, D. W. (1996) The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol*, 6, 817-25.
- RAYBON, J. J. & BOJE, K. M. (2007) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of gamma-hydroxybutyric acid during tolerance in rats: effects on extracellular dopamine. *J Pharmacol Exp Ther*, 320, 1252-60.
- REJNIUK, V. L., SCHAFER, T. V. & IVNITSKY, J. J. (2008) Ammonia potentiates the lethal effect of ethanol on rats. *Bull Exp Biol Med*, 145, 741-3.
- REZVANI, A. H., MACK, C. M., CROVI, S. I. & MYERS, R. D. (1986) Central Ca⁺⁺-channel blockade reverses ethanol-induced poikilothermia in the rat. *Alcohol*, 3, 273-9.
- RISTUCCIA, R. C., HERNANDEZ, M., WILMOUTH, C. E. & SPEAR, L. P. (2007) Differential expression of ethanol-induced hypothermia in adolescent and adult rats induced by pretest familiarization to the handling/injection procedure. *Alcohol Clin Exp Res*, 31, 575-81.
- RISTUCCIA, R. C. & SPEAR, L. P. (2004) Adolescent ethanol sensitivity: hypothermia and acute tolerance. *Ann N Y Acad Sci*, 1021, 445-7.
- RISTUCCIA, R. C. & SPEAR, L. P. (2008) Autonomic responses to ethanol in adolescent and adult rats: a dose-response analysis. *Alcohol*, 42, 623-9.
- ROBINSON, R. W., WHITE, D. P. & ZWILLICH, C. W. (1985) Moderate alcohol ingestion increases upper airway resistance in normal subjects. *Am Rev Respir Dis*, 132, 1238-41.
- ROBINSON, R. W. & ZWILLICH, C. W. (1985) The effect of drugs on breathing during sleep. *Clin Chest Med*, 6, 603-14.
- ROBSON, P. (2001) Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *Br J Psychiatry*, 178, 107-15.
- ROIKO, S. A., FELMLEE, M. A. & MORRIS, M. E. (2012) Brain uptake of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid in rats. *Drug Metab Dispos*, 40, 212-8.
- ROINE, R. P., GENTRY, R. T., LIM, R. T., JR., BARAONA, E. & LIEBER, C. S. (1991) Effect of concentration of ingested ethanol on blood alcohol levels. *Alcohol Clin Exp Res*, 15, 734-8.

- ROMM, E. & COLLINS, A. C. (1987) Body temperature influences on ethanol elimination rate. *Alcohol*, 4, 189-98.
- RONEN, A., CHASSIDIM, H. S., GERSHON, P., PARMET, Y., RABINOVICH, A., BAR-HAMBERGER, R., CASSUTO, Y. & SHINAR, D. (2010) The effect of alcohol, THC and their combination on perceived effects, willingness to drive and performance of driving and non-driving tasks. *Accid Anal Prev*, 42, 1855-65.
- ROSENSTEIN, R., MCCARTHY, L. E. & BORISON, H. L. (1968) Respiratory effects of ethanol and procaine injected into the cerebrospinal fluid of the brainstem in cats. *J Pharmacol Exp Ther*, 162, 174-81.
- ROTH, R. H. (1970) Formation and regional distribution of gamma-hydroxybutyric acid in mammalian brain. *Biochem Pharmacol*, 19, 3013-9.
- ROTH, R. H., DELGADO, J. M. & GIARMAN, N. J. (1966) Gamma-butyrolactone and gamma-hydroxybutyric acid. II. The pharmacologically active form. *Int J Neuropharmacol*, 5, 421-8.
- ROUSSEL, O., SUPPLY, B. & PERRIN, M. (2008) Intoxication au méprobamate : à propos de deux cas. *Ann Toxicol Anal*, 20, 89-95.
- SANNA, E., TALANI, G., BUSONERO, F., PISU, M. G., PURDY, R. H., SERRA, M. & BIGGIO, G. (2004) Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABAA receptor activity in rat hippocampus. *J Neurosci*, 24, 6521-30.
- SANTHAKUMAR, V., WALLNER, M. & OTIS, T. S. (2007) Ethanol acts directly on extrasynaptic subtypes of GABAA receptors to increase tonic inhibition. *Alcohol*, 41, 211-21.
- SANUDO-PENA, M. C., ROMERO, J., SEALE, G. E., FERNANDEZ-RUIZ, J. J. & WALKER, J. M. (2000) Activational role of cannabinoids on movement. *Eur J Pharmacol*, 391, 269-74.
- SARKOLA, T., ILES, M. R., KOHLENBERG-MUELLER, K. & ERIKSSON, C. J. (2002) Ethanol, acetaldehyde, acetate, and lactate levels after alcohol intake in white men and women: effect of 4-methylpyrazole. *Alcohol Clin Exp Res*, 26, 239-45.
- SCHARF, M. B., LAI, A. A., BRANIGAN, B., STOVER, R. & BERKOWITZ, D. B. (1998) Pharmacokinetics of gammahydroxybutyrate (GHB) in narcoleptic patients. *Sleep*, 21, 507-14.
- SCHEP, L. J., KNUDSEN, K., SLAUGHTER, R. J., VALE, J. A. & MEGARBANE, B. (2012) The clinical toxicology of gamma-hydroxybutyrate, gamma-butyrolactone and 1,4-butanediol. *Clin Toxicol (Phila)*, 50, 458-70.
- SCHMID, K., NIEDERHOFFER, N. & SZABO, B. (2003) Analysis of the respiratory effects of cannabinoids in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 368, 301-308.
- SCHWIN, R., GOODWIN, D. W. & HILL, S. Y. (1973) Marihuana and tidal volume. *JAMA*, 223, 194-5.
- SEBE, J. Y., EGGERS, E. D. & BERGER, A. J. (2003) Differential effects of ethanol on GABA(A) and glycine receptor-mediated synaptic currents in brain stem motoneurons. *J Neurophysiol*, 90, 870-5.
- SEIXAS, F. A. (1975) Alcohol and its drug interactions. *Ann Intern Med*, 83, 86-92.

- SHARIR, H. & ABOOD, M. E. (2010) Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther*, 126, 301-13.
- SHARKAWI, M. (1984) In vivo inhibition of liver alcohol dehydrogenase by ethanol administration. *Life Sci*, 35, 2353-7.
- SHBAIR, M. K., ELJABOUR, S. & LHERMITTE, M. (2010) Drugs involved in drug-facilitated crimes: part I: alcohol, sedative-hypnotic drugs, gamma-hydroxybutyrate and ketamine. A review. *Ann Pharm Fr*, 68, 275-85.
- SIEMENS, A. J. (1980) Effects of Cannabis in Combination With Ethanol and Other Drugs. IN PETERSEN, R. C. (Ed.) *Marijuana Research Findings: 1980*. Rockville, Department of Health and Human Services.
- SILVERI, M. M. & SPEAR, L. P. (2000) Ontogeny of ethanol elimination and ethanol-induced hypothermia. *Alcohol*, 20, 45-53.
- SMITH, A. A., ENGELSHER, C. & CROFFORD, M. (1975a) Modulation of the respiratory depressant effect of ethanol by 5-hydroxytryptamine. *J Pharm Pharmacol*, 27, 60-1.
- SMITH, A. A., ENGELSHER, C. & CROFFORD, M. (1975b) Respiratory depressant effects of ethanol: mediation by serotonin. *Adv Exp Med Biol*, 59, 407-17.
- SMITH, A. A., ENGELSHER, C. & CROFFORD, M. (1976) Respiratory or analgesic actions of ethanol and other narcotics: modulation by biogenic amines. *Ann N Y Acad Sci*, 273, 256-62.
- SMITH, M. E. & NEWMAN, H. W. (1959) The rate of ethanol metabolism in fed and fasting animals. *J Biol Chem*, 234, 1544-9.
- SNEAD, O. C., 3RD, FURNER, R. & LIU, C. C. (1989) In vivo conversion of gamma-aminobutyric acid and 1,4-butanediol to gamma-hydroxybutyric acid in rat brain. Studies using stable isotopes. *Biochem Pharmacol*, 38, 4375-80.
- SRINIVAS, S. R., GOPAL, E., ZHUANG, L., ITAGAKI, S., MARTIN, P. M., FEI, Y. J., GANAPATHY, V. & PRASAD, P. D. (2005) Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem J*, 392, 655-64.
- ST-JOHN, W. M. & PATON, J. F. (2000) Characterizations of eupnea, apneusis and gasping in a perfused rat preparation. *Respir Physiol*, 123, 201-13.
- STRICKLAND, R. M., FELGATE, P. & CALDICOTT, D. G. (2005) Survival of massive gamma-hydroxybutyrate/1,4-butanediol overdose. *Emerg Med Australas*, 17, 281-3.
- STRUBELT, O., SIEGERS, C. P. & BREINING, H. (1974) Comparative study of the absorption, elimination and acute hepatotoxic action of ethanol in guinea pigs and rats. *Arch Toxicol*, 32, 83-95.
- SZABO, B., PFITZER, T. & NIEDERHOFFER, N. (2002) Central respiratory effects of cannabinoids in rats [abstract]. *12th Annual symposium on the Cannabinoids*. . Pacific Grove, International Cannabinoid Research Society.
- TAKEDA, R. & HAJI, A. (1990) Effects of ethanol on expiratory neuronal activities in decerebrated cats. *Pharmacol Toxicol*, 66, 190-6.
- TARAKANOV, I. A., GOLOVATIUK, E. A., TURSKAIA, E. R. & SAFONOV, V. A. (1993) [The development of periodic apneic breathing during the activation of the GABA-ergic system of the brain]. *Biull Eksp Biol Med*, 115, 583-7.

- TARAKANOV, I. A., SAFONOV, V. A., SEMKINA, G. A. & GOLOVATIUK, E. A. (1992) [An experimental model of apneusis and periodic respiration]. *Biull Eksp Biol Med*, 114, 24-7.
- TASSIN, J.-P. (2000) La transmission des connaissances en neurobiologie. *Drogues savoir plus, les actes du colloque de la Sorbonne, 1ère rencontre interministérielle, 10 décembre 1999*. Comité français d'éducation pour la santé (CFES) ed. Paris.
- TAVEIRA DA SILVA, A. M., HARTLEY, B., HAMOSH, P., QUEST, J. A. & GILLIS, R. A. (1987) Respiratory depressant effects of GABA alpha- and beta-receptor agonists in the cat. *J Appl Physiol*, 62, 2264-72.
- TAYLOR, A. N., TIO, D. L., BANDO, J. K., TRUONG, A. H. & PROLO, P. (2009) Sex differences in ethanol-induced hypothermia in ethanol-naive and ethanol-dependent/withdrawn rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 33, 60-9.
- TAYLOR, N. C., LI, A. & NATTIE, E. E. (2005) Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. *J Physiol*, 566, 543-57.
- TEPPEMA, L. J. & DAHAN, A. (2010) The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol Rev*, 90, 675-754.
- TETRAULT, J. M., CROTHERS, K., MOORE, B. A., MEHRA, R., CONCATO, J. & FIELLIN, D. A. (2007) Effects of marijuana smoking on pulmonary function and respiratory complications: a systematic review. *Arch Intern Med*, 167, 221-8.
- THAI, D., DYER, J. E., BENOWITZ, N. L. & HALLER, C. A. (2006) Gamma-hydroxybutyrate and ethanol effects and interactions in humans. *J Clin Psychopharmacol*, 26, 524-9.
- TICHO, S. R., STOJANOVIC, M., LEKOVIC, G. & RADULOVACKI, M. (1992) Effects of ethanol injection to the preoptic area on sleep and temperature in rats. *Alcohol*, 9, 275-8.
- TIMBY, N., ERIKSSON, A. & BOSTROM, K. (2000) Gamma-hydroxybutyrate associated deaths. *Am J Med*, 108, 518-9.
- TOPPING, D. L., SNOSWELL, A. M., STORER, G. B., FISHLOCK, R. C. & TRIMBLE, R. P. (1984) Dependence on blood acetate concentration of the metabolic effects of ethanol in perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 800, 103-5.
- TREE, K., CARAVAGNA, C., HILAIRE, G., PEYRONNET, J. & CAYETANOT, F. (2010) Anandamide centrally depresses the respiratory rhythm generator of neonatal mice. *Neuroscience*, 170, 1098-109.
- TSENG, A. H., HARDING, J. W. & CRAFT, R. M. (2004) Pharmacokinetic factors in sex differences in Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced behavioral effects in rats. *Behav Brain Res*, 154, 77-83.
- TYGSTROP, N., WINKLER, K. & LUNDQUIST, F. (1965) The Mechanism Of The Fructose Effect On The Ethanol Metabolism Of The Human Liver. *J Clin Invest*, 44, 817-30.
- ULRICH, D. & BETTLER, B. (2007) GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol*, 17, 298-303.

- VALIVETI, S., AGU, R. U., HAMMELL, D. C., PAUDEL, K. S., EARLES, D. C., WERMELING, D. P. & STINCHCOMB, A. L. (2007) Intranasal absorption of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and WIN55,212-2 mesylate in rats. *Eur J Pharm Biopharm*, 65, 247-52.
- VALIVETI, S. & STINCHCOMB, A. L. (2004) Liquid chromatographic-mass spectrometric quantitation of Delta9-tetrahydrocannabinol and two metabolites in pharmacokinetic study plasma samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 803, 243-8.
- VAN DEN BROEK, M. P., GROENENDAAL, F., EGBERTS, A. C. & RADEMAKER, C. M. (2010) Effects of hypothermia on pharmacokinetics and pharmacodynamics: a systematic review of preclinical and clinical studies. *Clin Pharmacokinet*, 49, 277-94.
- VAN DEN HOOGEN, R. H. & COLPAERT, F. C. (1986) Respiratory effects of morphine in awake unrestrained rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 237, 252-9.
- VAN NIEUWENHUIJZEN, P. S. & MCGREGOR, I. S. (2009) Sedative and hypothermic effects of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in rats alone and in combination with other drugs: assessment using biotelemetry. *Drug Alcohol Depend*, 103, 137-47.
- VAN SASSENBROECK, D. K., DE PAEPE, P., BELPAIRE, F. M., BOON, P. A. & BUYLAERT, W. A. (2002) Influence of hypovolemia on the pharmacokinetics and electroencephalographic effect of gamma-hydroxybutyrate in the rat. *Anesthesiology*, 97, 1218-26.
- VAN SASSENBROECK, D. K., DE PAEPE, P., BELPAIRE, F. M. & BUYLAERT, W. A. (2003) Characterization of the pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between gamma-hydroxybutyrate and ethanol in the rat. *Toxicol Sci*, 73, 270-8.
- VAN SASSENBROECK, D. K., DE PAEPE, P., BELPAIRE, F. M., ROSSEEL, M. T., MARTENS, P., BOON, P. A. & BUYLAERT, W. A. (2001) Relationship between gamma-hydroxybutyrate plasma concentrations and its electroencephalographic effects in the rat. *J Pharm Pharmacol*, 53, 1687-96.
- VARVEL, S. A., BRIDGEN, D. T., TAO, Q., THOMAS, B. F., MARTIN, B. R. & LICHTMAN, A. H. (2005) Delta9-tetrahydrocannabinol accounts for the antinociceptive, hypothermic, and cataleptic effects of marijuana in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 314, 329-337.
- VECCHIO, L. M., GRACE, K. P., LIU, H., HARDING, S., LE, A. D. & HORNER, R. L. (2010) State-dependent vs. central motor effects of ethanol on breathing. *J Appl Physiol*, 108, 387-400.
- VIJAYARAGHAVAN, R., SCHAPER, M., THOMPSON, R., STOCK, M. F. & ALARIE, Y. (1993) Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract. *Arch Toxicol*, 67, 478-90.
- VILLA, A. F., HOUZE, P., MONIER, C., RISEDE, P., SARHAN, H., BORRON, S. W., MEGARBANE, B., GARNIER, R. & BAUD, F. J. (2007) Toxic doses of paraoxon alter the respiratory pattern without causing respiratory failure in rats. *Toxicology*, 232, 37-49.
- VIVIAN, J. A., KISHIOKA, S., BUTELMAN, E. R., BROADBEAR, J., LEE, K. O. & WOODS, J. H. (1998) Analgesic, respiratory and heart rate effects of cannabinoid and opioid agonists in rhesus monkeys: antagonist effects of SR 141716A. *J Pharmacol Exp Ther*, 286, 697-703.

- VONGHIA, L., LEGGIO, L., FERRULLI, A., BERTINI, M., GASBARRINI, G. & ADDOLORATO, G. (2008) Acute alcohol intoxication. *Eur J Intern Med*, 19, 561-7.
- WANG, Q., DARLING, I. M. & MORRIS, M. E. (2006) Transport of gamma-hydroxybutyrate in rat kidney membrane vesicles: Role of monocarboxylate transporters. *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 751-61.
- WANG, Q., LU, Y. & MORRIS, M. E. (2007) Monocarboxylate transporter (MCT) mediates the transport of gamma-hydroxybutyrate in human kidney HK-2 cells. *Pharm Res*, 24, 1067-78.
- WANG, Q. & MORRIS, M. E. (2007a) Flavonoids modulate monocarboxylate transporter-1-mediated transport of gamma-hydroxybutyrate in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos*, 35, 201-8.
- WANG, Q. & MORRIS, M. E. (2007b) The role of monocarboxylate transporter 2 and 4 in the transport of gamma-hydroxybutyric acid in mammalian cells. *Drug Metab Dispos*, 35, 1393-9.
- WANG, Q., WANG, X. & MORRIS, M. E. (2008a) Effects of L-lactate and D-mannitol on gamma-hydroxybutyrate toxicokinetics and toxicodynamics in rats. *Drug Metab Dispos*, 36, 2244-51.
- WANG, X., WANG, Q. & MORRIS, M. E. (2008b) Pharmacokinetic interaction between the flavonoid luteolin and gamma-hydroxybutyrate in rats: potential involvement of monocarboxylate transporters. *Aaps J*, 10, 47-55.
- WANG, Y., CHIOU, A. L., JENG, C. H., YANG, S. T. & LIN, J. C. (2000) Ethanol potentiates dopamine release during acute hypoxia in rat striatum. *Pharmacol Biochem Behav*, 66, 679-85.
- WARD, C. O., LAU CAM, C. A., TANG, A. S., BREGLIA, R. J. & JAROWSKI, C. I. (1972) Effects of lysine on toxicity and depressant effects of ethanol in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 22, 422-6.
- WASIELEWSKI, J. A. & HOLLOWAY, F. A. (2001) Alcohol's interactions with circadian rhythms. A focus on body temperature. *Alcohol Res Health*, 25, 94-100.
- WATANABE, K., NARIMATSU, S., MATSUNAGA, T., YAMAMOTO, I. & YOSHIMURA, H. (1993) A cytochrome P450 isozyme having aldehyde oxygenase activity plays a major role in metabolizing cannabinoids by mouse hepatic microsomes. *Biochem Pharmacol*, 46, 405-11.
- WATANABE, K., TANAKA, T., YAMAMOTO, I. & YOSHIMURA, H. (1988) Brain microsomal oxidation of delta 8- and delta 9-tetrahydrocannabinol. *Biochem Biophys Res Commun*, 157, 75-80.
- WATANABE, K., YAMAORI, S., FUNAHASHI, T., KIMURA, T. & YAMAMOTO, I. (2007) Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabinol by human hepatic microsomes. *Life Sci*, 80, 1415-9.
- WEIL, A. T., ZINBERG, N. E. & NELSEN, J. M. (1968) Clinical and psychological effects of marihuana in man. *Science*, 162, 1234-42.

- WENNINGER, J. M., OLSON, E. B., JR., COTTER, C. J., THOMAS, C. F. & BEHAN, M. (2009) Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in aging male vs. aging female rats. *J Appl Physiol*, 106, 1522-8.
- WIBERG, G. S., COLDWELL, B. B. & TRENHOLM, H. L. (1969) Toxicity of ethanol-barbiturate mixtures. *J Pharm Pharmacol*, 21, 232-6.
- WIBERG, G. S., SAMSON, J. M., MAXWELL, W. B., COLDWELL, B. B. & TRENHOLM, H. L. (1971) Further studies on the acute toxicity of ethanol in young and old rats: relative importance of pulmonary excretion and total body water. *Toxicol Appl Pharmacol*, 20, 22-9.
- WIBERG, G. S., TRENHOLM, H. L. & COLDWELL, B. B. (1970) Increased ethanol toxicity in old rats: changes in LD50, in vivo and in vitro metabolism, and liver alcohol dehydrogenase activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 16, 718-27.
- WILEY, J. L., JEFFERSON, R. G., GRIFFIN, G., LIDDLE, J., YU, S., HUFFMAN, J. W. & MARTIN, B. R. (2002) Paradoxical pharmacological effects of deoxy-tetrahydrocannabinol analogs lacking high CB1 receptor affinity. *Pharmacology*, 66, 89-99.
- WILKINSON, P. K. (1980) Pharmacokinetics of ethanol: a review. *Alcohol Clin Exp Res*, 4, 6-21.
- WILKINSON, P. K., REYNOLDS, G., HOLMES, O. D., YANG, S. & WILKIN, L. O. (1980) Nonlinear pharmacokinetics of ethanol: the disproportionate AUC-dose relationship. *Alcohol Clin Exp Res*, 4, 384-90.
- WILKINSON, P. K. & RHEINGOLD, J. L. (1981) Arterial-venous blood alcohol concentration gradients. *J Pharmacokinet Biopharm*, 9, 279-307.
- WRIGHT, A. & TERRY, P. (2002) Modulation of the effects of alcohol on driving-related psychomotor skills by chronic exposure to cannabis. *Psychopharmacology (Berl)*, 160, 213-219.
- WU, H. D., WRIGHT, R. S., SASSOON, C. S. & TASHKIN, D. P. (1992) Effects of smoked marijuana of varying potency on ventilatory drive and metabolic rate. *Am Rev Respir Dis*, 146, 716-721.
- YEATMAN, D. T. & REID, K. (2003) A study of urinary endogenous gamma-hydroxybutyrate (GHB) levels. *J Anal Toxicol*, 27, 40-2.
- YOUNG, A. B. & CHU, D. (1990) Distribution of GABA_A and GABA_B Receptors in Mammalian Brain: Potential Targets for Drug Development. *Drug Dev Res*, 21, 161-7.
- ZAHLTEN, R. N., JACOBSON, C. J. & NEIJTEK, M. E. (1980) Underestimation of alcohol dehydrogenase as a result of various technical pitfalls of the enzyme assay. *Biochem Pharmacol*, 29, 1973-6.
- ZHANG, G. F., SADHUKHAN, S., IBARRA, R. A., LAUDEN, S. M., CHUANG, C. Y., SUSHAILO, S., CHATTERJEE, P., ANDERSON, V. E., TOCHTROP, G. P. & BRUNENGRABER, H. (2012) Metabolism of gamma-hydroxybutyrate in perfused rat livers. *Biochem J*, 444, 333-41.
- ZVOSEC, D. L., SMITH, S. W. & HALL, B. J. (2009) Three deaths associated with use of Xyrem. *Sleep Med*, 10, 490-3.

- ZVOSEC, D. L., SMITH, S. W., MCCUTCHEON, J. R., SPILLANE, J., HALL, B. J. & PEACOCK, E. A. (2001) Adverse events, including death, associated with the use of 1,4-butanediol. *N Engl J Med*, 344, 87-94.
- ZVOSEC, D. L., SMITH, S. W., PORRATA, T., STROBL, A. Q. & DYER, J. E. (2011) Case series of 226 gamma-hydroxybutyrate-associated deaths: lethal toxicity and trauma. *Am J Emerg Med*, 29, 319-32.